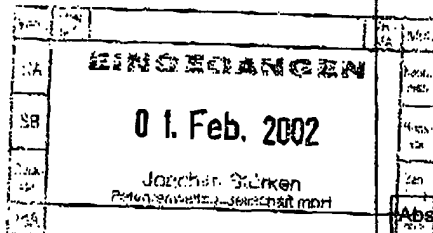


Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An:

JOACHIM STÜRKEN
Engesserstrasse 4b
D-79108 Freiburg
ALLEMAGNE



PCT

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG
DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNGSBERICHTS
(Regel 71.1 PCT)

Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr) 31.01.2002

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts
00081.7

WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE00/03374

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)
27/09/2000

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)
01/10/1999

Anmelder
GREENOVATION PFLANZENBIOTECHNOLOGIE GMBH et al.

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
2. Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen - dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amts wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.

4. ERINNERUNG

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde



Europäisches Patentamt
D-80298 München
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Bevollmächtigter Bediensteter

Papiol Rovira, M

Tel. +49 89 2399-7199



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

STÜRKEN, Joachim
Engesserstrasse 4b
79108 Freiburg
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 15 janvier 2002 (15.01.02)	
Applicant's or agent's file reference 00081.7	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/DE00/03374	International filing date (day/month/year) 27 septembre 2000 (27.09.00)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant
 ☐ the inventor
 ☐ the agent
 ☐ the common representative

Name and Address GREENOVATION PFLANZENBIOTECHNOLOGIE GMBH Sonnenstrasse 5 79104 Freiburg Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person
 ☐ the name
 ☒ the address
 ☐ the nationality
 ☐ the residence

Name and Address GREENOVATION PFLANZENBIOTECHNOLOGIE GMBH Bötzingen Strasse 29b 79111 Freiburg im Breisgau Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned
<input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Simin Baharlou
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

HA	18. Jan. 2002	SA
PO	Joachim Stürken	PO
SA	Patent Cooperation Treaty	SA
PO	PCT	PO

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

STÜRKEN, Joachim
Engesserstrasse 4b
79108 Freiburg
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 15 January 2002 (15.01.02)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 00081.7	
International application No. PCT/DE00/03374	International filing date (day/month/year) 27 September 2000 (27.09.00)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address GREENOVATION PFLANZENBIOTECHNOLOGIE GMBH Sonnenstrasse 5 79104 Freiburg Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

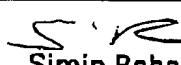
☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address GREENOVATION PFLANZENBIOTECHNOLOGIE GMBH Bötzingen Strasse 29b 79111 Freiburg im Breisgau Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☐ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority ☒ the elected Offices concerned
☒ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer  Simin Baharlou
Facsimile No.: (41-22) 740.14.36	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

Form PCT/IB/306 (March 1994)

004589654

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

STÜRKEN, Joachim
Engesserstrasse 4b
79108 Freiburg
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 05 March 2002 (05.03.02)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 00081.7	
International application No. PCT/DE00/03374	International filing date (day/month/year) 27 September 2000 (27.09.00)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address GORR, Gilbert Wietzegegraben 64 30179 Hannover Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:


☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address GORR, Gilbert Mohnacker 26 79112 Freiburg im Breisgau Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☐ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority ☒ the elected Offices concerned
☒ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer  Simin Baharlou
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 335.83.39

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

STÜRKEN, Joachim
Engesserstrasse 4b
79108 Freiburg
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 16 avril 2002 (16.04.02)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 00081.7	
International application No. PCT/DE00/03374	International filing date (day/month/year) 27 septembre 2000 (27.09.00)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant

 ☐ the inventor

 ☐ the agent

 ☐ the common representative

Name and Address GREENOVATION PFLANZENBIOTECHNOLOGIE GMBH Bötzingen Strasse 29b 79111 Freiburg im Breisgau Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person

 ☒ the name

 ☐ the address

 ☐ the nationality

 ☐ the residence

Name and Address GREENOVATION BIOTECH GMBH Bötzingen Strasse 29b 79111 Freiburg im Breisgau Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Dorothee MÜLHAUSEN Telephone No.: (41-22) 338.83.38
--	---

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 10 September 2001 (10.09.01)	
International application No. PCT/DE00/03374	Applicant's or agent's file reference 00081.7
International filing date (day/month/year) 27 September 2000 (27.09.00)	Priority date (day/month/year) 01 October 1999 (01.10.99)
Applicant RESKI, Ralf et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
09 April 2001 (09.04.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Farid ABBOU
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

**Attached is a second copy of International Publication No. WO 01/25456 A2
published on 12 April 2001 (corresponding to International Application No.
PCT/DE00/03374 filed 27 September 2000) in compliance with the requirements of
35 U.S.C. 154(d)(4).**

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
12. April 2001 (12.04.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/25456 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/82,
C12P 21/02, A01H 5/00 // C07K 14/52

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/03374

(22) Internationales Anmeldedatum:
27. September 2000 (27.09.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 47 290.4 1. Oktober 1999 (01.10.1999) DE

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): GREENOVATION PFLANZENBIOTECHNOLOGIE GMBH [DE/DE]; Sonnenstrasse 5, 79104 Freiburg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): RESKI, Ralf [DE/DE]; Am Osterbach 26, 79254 Oberried (DE). GORR, Gilbert [DE/DE]; Wietzegraben 64, 30179 Hannover (DE).

(74) Anwalt: STÜRKEN, Joachim; Engesserstrasse 4b; 79108 Freiburg (DE).

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR PRODUCTION OF PROTEINACEOUS SUBSTANCES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG PROTEINÖSER SUBSTANZEN

(57) Abstract: The invention relates to a new method for production of heterologous proteinaceous substances in plant material. In the preferred method selected complete moss plants are cultivated and the desired target substances obtained from the culture medium essentially without disturbing the produced tissues and cells. The method allows a cost effective production of all manner of heterologous proteins in their respective active form under standardisable conditions.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung beschreibt ein neues Verfahren zur Herstellung heterologer proteinöser Substanzen in pflanzlichen Materialien. Nach einer bevorzugten Ausführungsform werden ausdifferenzierte vollständige Moospflanzen kultiviert und die Gewinnung der gewünschten Zielsubstanz aus dem Kulturmedium erfolgt im wesentlichen ohne Aufbrechen der produzierenden Gewebe oder Zellen. Unter Anwendung des beschriebenen Verfahrens können jedwede heterologe Proteine in ihrer jeweiligen biologisch aktiven Form kostengünstig und unter standardisierbaren Bedingungen hergestellt werden.

WO 01/25456 A2



Verfahren zur Herstellung proteinöser Substanzen

Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein das Gebiet der Herstellung proteinöser Substanzen in pflanzlichen Materialien.

5 Insbesondere betrifft die Erfindung ein neues Verfahren zur Herstellung gewünschter proteinöser Substanzen in Moosen.

Die Verwendung biotechnologischer Verfahren zu Produktionszwecken stellt für den Menschen eine bedeutende Möglichkeit dar, 10 Substanzen zu produzieren, die auf anderem Weg, z.B. durch chemische Synthese, gar nicht bzw. nicht wirtschaftlich herzustellen sind und als Rohstoffe in der Natur nicht in ausreichenden Mengen zur Verfügung stehen. Obwohl mehr als 10.000 Sekundärmetabolite aus Pflanzen bekannt sind, werden nur wenige 15 dieser Verbindungen mit Hilfe von pflanzlichen Zellkulturen in technischen Maßstäben gewonnen. Bei diesen Substanzen handelt es sich in erster Linie um Sekundärmetabolite, die pharmazeutische Wirkungen zeigen. Beispielhaft seien hier a) Berberin (Produktion im 4000 l-Maßstab) mit bakteriostatischer und fungizider 20 Wirkung (Y. Fujita und M. Tabata, in: Plant tissue and cell culture, plant science; Vol. 3, S. 169, C.E. Green et al. (Hrsg.), A. R. Liss Inc., New York (1987)), b) Shikonin (750 l-Maßstab) mit antibiotischer und entzündungshemmender Wirkung (M. Tabata und Y. Fujita, in: Biotechnology in plant science; S. 25 207-218, P. Day et al. (Hrsg.), Academic Press, Orlando (1985)), und c) Paclitaxel (75000 l-Maßstab), besser bekannt als Taxol, mit Antitumorwirkung (M. Jaziri et al., *Taxus* sp. cell, tissue and organ cultures as alternative sources for taxoids production: a literature survey, Plant Cell Tiss. Org. Cult., 46, S. 30 59-75 (1996)) genannt.

Ein weiteres wichtiges biotechnologisches Verfahren, bei dem pflanzliche Zellkulturen genutzt werden, stellt die Biotransformation von Digitoxin in Digoxin, ein Herz- und Kreislaufmedika- 35 ment, dar. Diese stereospezifische Hydroxylierungsreaktion gelingt mit hohen Ausbeuten in Bioreaktorkulturen von *Digitalis*

lanata (E. Reinhard und W. Kreis, Kultivierung von pflanzlichen Zellen im Bioreaktor, Bio. Engin., 5, S. 135-136 (1989)). Eine aktuelle und umfangreiche Übersicht der Verwendung pflanzlicher Zellkulturen in der Biotechnologie findet sich bei H.-P. Mühl-
5 bach, Use of plant cell cultures in biotechnology, Biotechnol. Annu. Rev., 4, S. 113-176 (1998).

Die Entwicklung von genetischen Transformationsmethoden für höhere Pflanzen zu Beginn der 80er Jahre machte es möglich, die
10 Produktivität von Pflanzen für bestimmte sekundäre Inhaltsstoffe durch Transformation der Gene für bestimmte Schlüsselenzyme der entsprechenden Stoffwechselwege deutlich zu erhöhen. Neben der Verwendung transgener vollständiger Pflanzen wurden auch pflanzliche Zellkulturen genutzt. Beispielhaft sei hier die Überex-
15 pression einer bakteriellen Lysindecaboxylase in transgenen Wurzelhaarkulturen von *Nicotiana tabacum* genannt, die zu einer Erhöhung der Ausbeuten der biogenen Amine Cadaverin und Anabasin um das bis zu 14-fache führte (J. Berlin et al., Genetic modifi-
20 cation of plant secondary metabolism: Alteration of product levels by overexpression of amino acid decarboxylases, in: Advances in Plant Biology, Studies in Plant Science, Vol. 4, S. 57-81, D.D.Y. Ryu und S. Furasaki (Hrsg.), Elsevier, Amsterdam (1994)).

25 Durch die Möglichkeit des DNA-Transfers in Pflanzen wurden allerdings nicht nur quantitative und qualitative Veränderungen von Pflanzeninhaltsstoffen möglich. Pflanzen und pflanzliche Zellkulturen wurden darüber hinaus für die Herstellung heterolo-
ger Proteine interessant (A.S. Moffat, High-Tech plants promise
30 a bumper crop of new products, Science 256, S. 770-771 (1992), wobei im wesentlichen zwei unterschiedliche Ansätze gewählt wurden.

Der eine Ansatz beinhaltet die Produktion heterologer Proteine in transgenen vollständigen Pflanzen. Neben der Produktion von Antikörpern in transgenen Tabakpflanzen (J.K.-C.Ma et al., Generation and assembly of secretory antibodies in plants, Science 268, S. 716-719 (1995)) wurde die Expression und richtige Prozessierung von humanem Serumalbumin sowohl in transgenen Tabak- als auch in Kartoffelpflanzen beschrieben (P.C. Sijmons et al., Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants, Bio/Techn., 8, S. 217-221 (1990)). Ebenfalls in transgenen Tabakpflanzen wurde der humane epidermale Wachstumsfaktor (hEGF) exprimiert (A.-H. Salமானian et al., Synthesis and expression of the gene for human epidermal growth factor in transgenic potato plants, Biotechnol. Lett., 18, S. 1095-1098 (1996)). Aber auch andere Pflanzen wurden verwendet. Die Produktion von Leu-Enkephalin wurde erfolgreich mit *Arabidopsis thaliana* und *Brassica napus* durchgeführt (E. Krebbers und J. Vandekerckhove, Production of peptides in plant seeds, Tibtech., 8, S. 1-3. (1990)). Ferner wurden transgene *Vigna unguiculata* Pflanzen für die Expression von chimären Viruspartikeln, die als Vaccine dienen, verwendet (K. Dalsgaard et al., Plant-derived vaccine protects target animals against a viral disease, Nat. Biotech., 15, S. 248-252 (1997)).

Ein grundsätzlicher Nachteil bei der Verwendung vollständiger Pflanzen wie der oben beispielhaft beschriebenen liegt in der Notwendigkeit ihrer zeitaufwendigen und kostenintensiven Kultivierung sowie in der für industrielle Produktionsmaßstäbe erforderlichen großdimensionierten Anbaufläche. Darüberhinaus erfordert die Aufreinigung der gewünschten Zielsubstanzen aus vollständigen Pflanzen in der Regel komplexe Verfahrensschritte, insbesondere dann, wenn an die Beschaffenheit und Qualität der Produkte hohe Anforderungen gestellt werden, wie es bei pharmazeutisch oder ernährungsphysiologisch einzusetzenden Substanzen der Fall ist.

Im zweiten Ansatz wurden transgene Tabakzellkulturen für die Produktion von Antikörpern genutzt. Beschrieben ist beispielsweise die Expression von Antikörpern und deren Sekretion ins Medium (N.S. Magnuson et al., Enhanced recovery of a secreted mammalian protein from suspension culture of genetically modified tobacco cells, Prot. Expr. Pur., 7, S. 220-228 (1996). Da die Aufreinigung heterologer Proteine aus Zellen einen hohen Aufwand erfordert, stellt die Sekretion des Zielproteins in das Medium eine deutliche Verbesserung dar. Darüber hinaus sprechen auch Sicherheitsaspekte für die Produktion rekombinanter, pharmazeutisch relevanter Proteine in Zellkulturen, da die transgenen Pflanzenzellen ausschließlich in Bioreaktoren kultiviert werden können und nicht freigesetzt werden müssen. Die Entwicklung von Bioreaktoren für heterotrophe pflanzliche Zellkulturen in größeren Maßstäben (z.B. M.L. Shuler et al., Bioreactor engineering as an enabling technology to tap biodiversity: The case of taxol., Ann. N. Y. Acad. Sci., 745, S. 455-461 (1994) machte die notwendige Massenkultur möglich.

Die grundsätzlichen Nachteile dieses zweiten Ansatzes unter Verwendung pflanzlicher Suspensionskulturen liegen in der geringen Wachstumsrate, der relativ langsamen Bildung von Sekundärmetaboliten, der Hemmung der Produktbildung bei hohen Zelldichten mit der Folge einer geringen volumetrischen Produktivität, der Bildung von Aggregaten und Zellwandbestandteilen, sowie in der erhöhten Sensitivität der Zellen gegenüber Scherkräften. Ferner ist zu berücksichtigen, daß bei Verwendung heterotropher Zellkulturen stets komplexe Medien mit einer Vielzahl z.T. teurer Inhaltsstoffe bereitgestellt werden müssen. Als gravierendster Nachteil ist jedoch das Auftreten somaklonaler Variationen in pflanzlichen *in vitro* Zellkulturen zu nennen, was zu quantitativen und qualitativen Veränderungen in der Produktion heterologer Proteine führt (s. z.B. M.G.K. Jones und K. Lindsey, Plant biotechnology, in: Molecular biology and biotechnology, J.M. Walker und E.W. Gingold (Hrsg.), 2.Aufl., Royal Soc. of

Chem., Burlington House, London (1988). Insbesondere im Zusammenhang mit der Herstellung von Pharmazeutika und anderen gewünschten Substanzen, deren behördliche Zulassung eine verlässliche Qualitätssicherung sowie ein standardisiertes Herstellungsverfahren fordert, ist eine Heterogenität der gebildeten Produkte und ihrer funktionellen Eigenschaften nicht hinnehmbar.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung liegt daher in der Bereitstellung eines Verfahrens zur standardisierten Herstellung heterologer proteinöser Substanzen in pflanzlichen Materialien, mit welchem sowohl die beschriebenen Nachteile der Verwendung vollständiger Pflanzen als auch die Nachteile der Verwendung von Zellkultursystemen im wesentlichen beseitigt werden.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe gelöst durch die Bereitstellung eines neuen Verfahrens zur Herstellung heterologer proteinöser Substanzen in pflanzlichen Materialien, bei dem vollständig differenzierte Moospflanzen unter Standardbedingungen kultiviert werden und die Gewinnung der hergestellten proteinösen Substanzen aus dem Kulturmedium im wesentlichen ohne Aufbrechen der produzierenden Gewebe oder Zellen erfolgt.

Der vorliegend verwendete Begriff „proteinöse Substanz“ umfaßt Peptide, Polypeptide sowie Proteine als auch Fragmente derselben, welche insbesondere für diagnostische, klinische, pharmazeutische und ernährungsphysiologische Zwecke geeignet sind. Umfaßt sind ferner solche Moleküle, die über peptidische Bindungen verfügen und von pflanzlichem Material translatiert werden.

Nach einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die gewünschte heterologe proteinöse Substanz in ihrer biologisch aktiven Form in das Kulturmedium freigesetzt.

Im Rahmen der vorliegenden Beschreibung bedeutet der Begriff „biologisch aktiv“, daß die mit diesem Attribut versehenen Zielsubstanzen über die für den jeweiligen Verwendungszweck gewünschten oder erforderlichen funktionellen Eigenschaften verfügen. Ist beispielsweise die Herstellung von Antikörpern gewünscht, so ist das produzierte Protein bzw. ein funktionelles Fragment desselben biologisch aktiv, wenn es in der Lage ist, die erwartete spezifische Bindung zum Antigen auszubilden. Für den Fachmann ist klar, daß man hierfür nicht immer das vollständige Protein benötigt sondern nach Epitopen oder niedermolekularen Strukturen suchen kann, welche die beabsichtigte biologische Aktivität bzw. Funktionalität sicherstellen. Ein Enzym ist beispielsweise biologisch aktiv, wenn es in der Lage ist, sein Zielsubstrat umzusetzen.

15 Nach einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird das pflanzliche Material in Form von vollständigen Moospflanzen in einem Kulturmedium kultiviert, welches im wesentlichen frei von Zuckern, Vitaminen und Phytohormonen bzw. funktionellen Fragmenten derselben ist.

Das erfindungsgemäße Verfahren bietet die Möglichkeit der Kultivierung vollständiger ausdifferenzierter Pflanzen unter standardisierbaren photoautotrophen Bedingungen, d.h. ohne das Erfordernis des Zusatzes von Zuckern, Vitaminen und Phytohormonen und dergleichen, wie es bei den im Stand der Technik bekannten heterotrophen Suspensions-Zellkultursystemen gefordert wird. Aufgrund der Verwendung eines kostengünstigen und einfachen Kulturmediums werden die Schritte zur Gewinnung und Aufreinigung der gewünschten Zielsubstanzen erheblich vereinfacht.

Das im erfindungsgemäßen Verfahren einzusetzende pflanzliche Material ist vorzugsweise eine vollständige Moospflanze, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Laubmoosen und Lebermoosen, wobei Spezies aus den Gattungen *Physcomitrella*, *Funaria*, *Sphag-*

num und *Ceratodon*, bzw. *Marchantia* und *Sphaerocarpos* besonders bevorzugt eingesetzt werden. Am meisten bevorzugt wird das erfindungsgemäße Verfahren unter Verwendung des Laubmooses *Physcomitrella patens* durchgeführt.

5

Nach einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kodiert das zur Transformation verwendete Nukleinsäurekonstrukt nicht nur die gewünschte proteinöse Substanz sondern auch ein Transit-Peptid für die Freisetzung der Substanz aus der Wirtszelle in das Kulturmedium. Jegliche dem Fachmann bekannte autologe und heterologe Nukleinsäuresequenzen sind erfindungsgemäß einsetzbar und können zur Schaffung einer Expressionskassette zur Transformation des Produzenten-Gewebes Verwendung finden. Besonders bevorzugt ist die Verwendung von Signalpeptiden für das endoplasmatische Retikulum oder den zellulären Transport.

Die zur vorliegenden Erfindung durchgeführten Arbeiten zeigen, das das für Zellkulturen oben beschriebene Problem der somaklonalen Variation in photoautotrophen Flüssigkulturen von Laubmoosen nicht existiert. Ferner bieten die erfindungsgemäß verwendeten Moose gegenüber anderen Systemen den Vorteil einer klaren Abfolge genau definierter Differenzierungsschritte (Chloronema, Caulonema, Knospen, Gametophoren), die durch Zugabe von Pflanzenhormonen (Indol-3-Essigsäure induziert die Caulonemabildung, Isopentenyl-Adenin die Bildung von Knospen) beeinflussbar sind (s. z.B. N.W. Ashton et al., Analysis of gametophytic development in the moss, *Physcomitrella patens*, using auxin and cytokinin resistant mutants, *Planta*, 144, S. 427-435 (1979)). Eine gezielte differenzierungsspezifische Expression heterologer Proteine in Bioreaktorkulturen wird somit ermöglicht, wobei eine sich synchron teilende reine und damit homogene Chloronema-Kultur aufgrund ihrer kontrollierbaren, gleichmäßigen Proteinproduktion im Bioreaktor und ihrer Eignung zur Verwendung hormonabhängiger oder differenzierungsspezifischer Promotoren erfindungsgemäß besonders bevorzugt geeignet ist.

Insbesondere für die Produktion von Proteinen, die eine kurze Halbwertszeit haben oder cytotoxische Wirkung besitzen, ist neben einem solchen Expressionssystem erfindungsgemäß auch ein induzierbares Promotorsystem verwendbar, wobei der 1'-Promotor
5 aus *Agrobacterium tumefaciens* besonder bevorzugt verwendet wird.

Die erfindungsgemäß vorgeschlagene Kultivierung von Moosen für die Produktion heterologer Proteine unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten kann beispielsweise unter Verwendung von *Physco-*
10 *mitrella* in Größenordnungen von 20 ml über 6 l bis zu 10 l Volumina oder mehr in Schüttelkulturen oder mit Luft begasten Glasgefäßen kultiviert werden (s. z.B. R. Reski, Zell- und molekularbiologische Untersuchungen der cytokinin-induzierbaren Gewebedifferenzierung und Chloroplastenteilung bei *Physcomitrel-*
15 *la patens* (Hedw.) B.S.G., Dissertation, Universität Hamburg (1990)). Da es sich hierbei um die Kultur differenzierter, photoautotropher Pflanzen handelt, müssen dem Medium weder Pflanzenhormone, noch Vitame, noch Zucker hinzugefügt werden. Die Kosten sind im Vergleich zu den komplexen Medien, die z.B.
20 für tierische Zellkulturen benötigt werden, um den Faktor 100 geringer. Erfindungsgemäß hat sich gezeigt, daß die Ausbeute an biologisch aktivem heterologen Protein im Kulturmedium in Gegenwart von PVP um das 35fache gesteigert werden kann, weshalb die Verwendung von PVP im Kulturmedium im erfindungsgemäßen
25 Verfahren bevorzugt ist.

Detaillierte Angaben über die Kultivierung weiterer erfindungsgemäß geeigneter Laubmoose wie beispielsweise *Leptobryum pyri-*
forme und *Sphagnum magellanicum* in Bioreaktoren sind im Stand
30 der Technik beschrieben (s. z.B. E. Wilbert, Biotechnologische Studien zur Massenkultur von Moosen unter besonderer Berücksichtigung des Arachidonsäurestoffwechsels, Dissertation, Universität Mainz (1991); H. Rudolph und S. Rasmussen, Studies on secondary metabolism of *Sphagnum* cultivated in bioreactors,

Crypt. Bot., 3, S. 67-73 (1992)). Im Rahmen der vorliegenden Erfindung besonders bevorzugt ist die Verwendung von *Physcomitrella*, insbesondere, da alle gängigen molekularbiologischen Techniken für diesen Organismus etabliert sind (Übersicht bei R. Reski, Development, genetics and molecular biology of mosses, 5 Bot. Acta, 111, S. 1-15 (1998)).

Für die biotechnologische Nutzung von *Physcomitrella* zur Produktion heterologer Proteine wurden geeignete Transformationssysteme 10 entwickelt. Erfolgreiche Transformationen wurden beispielsweise mit der "Particle gun" durch den direkten DNA-Transfer in Protonemagewebe durchgeführt. Ebenfalls erfolgreich war der PEG-vermittelte DNA-Transfer in Moosprotoplasten. Diese Transformationsmethode wurde für *Physcomitrella* mehrfach beschrieben und 15 führt sowohl zu transienten als auch zu stabilen Transformanten (s. z.B. K. Reutter und R. Reski, Production of a heterologous protein in bioreactor cultures of fully differentiated moss plants, Pl. Tissue culture, & Biotech., 2, S. 142-147 (1996)).

20 Obwohl die vorliegende Erfindung grundsätzlich zur Herstellung jedweder proteinöser Substanzen geeignet ist, wird nachfolgend die Herstellung eines pharmazeutisch relevanten Proteins am Beispiel des humanen "Vascular Endothelial Growth Factor" (VEGF) dargestellt.

25

Der VEGF wurde erstmals von N. Ferrara und W.J. Henzel isoliert (Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells, Biochem. Biophys. Res. Commun., 161, S. 851-858 (1989)) und als Regulationsfaktor für die kontrollierte Angiogenese und Endothelzellteilung 30 unter normalen physiologischen Bedingungen charakterisiert (N. Ferrara et al., The vascular endothelial growth factor family of polypeptides, J. Cell. Biochem., 47, S. 211-218 (1991)). Sie konnten ebenfalls zeigen, daß dieser Wachstumsfak-

tor sehr spezifisch auf vaskuläre Endothelzellen wirkt und für andere Zelltypen inaktiv ist. Der VEGF ist ein über Disulfidbrücken verknüpftes homodimeres Glykoprotein. Vier verschiedene Formen des humanen VEGF sind bekannt. Die vier Isoformen sind

5 121, 165, 189 und 206 Aminosäuren lang und entstehen durch alternatives Spleißen der VEGF-RNA. VEGF₂₀₆ wurde nur in einer fetalen Leber cDNA nachgewiesen, wogegen Transkripte von VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ und VEGF₁₈₉ in vielen Tumorzellen und Tumorgeweben detektiert werden konnten. Alle VEGF-Isoformen besitzen Leadersequenzen

10 für die Sekretion, aber nur die beiden kleinsten Formen werden effektiv sekretiert (s. z.B. G. Martiny-Baron und D. Marmé, VEGF-mediated tumor angiogenesis: A new target for cancer therapy, Curr. Opin. Biotechnol., 6, S. 675-680 (1995)).

15 Sowohl für die Entwicklung und Verbesserung bestehender Tumor-Therapieansätze als auch für die Charakterisierung des VEGF wurden und werden entsprechende Mengen des VEGF benötigt. Zu Beginn der zur vorliegenden Erfindung durchgeführten Arbeiten war ausschließlich die rekombinante Produktion des VEGF mittels

20 des Baculovirus-Expressionssystems in Insektenzellen beschrieben (z.B. B.L. Fiebich et al., Synthesis and assembly of functionally active human vascular endothelial growth factor homodimers in insect cells, Eur. J. Biochem., 211, S. 19-26 (1993)). Als weitere Produktionsorganismen kamen *Saccharomyces cerevisiae* (S.

25 Kondo et al., The shortest isoform of human vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF₁₂₁) produced by *Saccharomyces cerevisiae* promotes both angiogenesis and vascular permeability, Biochim. Biophys. Acta, 1243, S. 195-202 (1995)), die Hefe *Pichia pastoris* (D. Mohanraj et al., Expressi-

30 on of biologically active human vascular endothelial growth factor in Yeast, Growth factors, 12, S. 17-27 (1995)) und *Escherichia coli* (G. Siemeister et al., Expression of biologically active isoforms of the tumor angiogenesis factor VEGF in *Escherichia coli*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 222, S. 249-

II

255 (1996)) hinzu. Mit allen rekombinanten Systemen konnte biologisch aktiver VEGF produziert werden. Das *E. coli* Expressionssystem erfordert jedoch einen hohen Aufwand für die Aufreinigung und Rekonstitution des Proteins, da es in "Inclusion-Bodies" verpackt wird.

Beispiele

10

Zusammenfassung

Mit der Etablierung steuerbarer Massenkulturen von *Physcomitrella patens* (Reutter und Reski, a.a.O.) sowie von Methoden des DNA-Transfers in das Laubmoos *Physcomitrella patens* (K. Reutter, 15 Expression heterologer Gene in *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G., Dissertation, Universität Hamburg (1994)) waren die Grundvoraussetzungen für eine biotechnologische Nutzung dieser Pflanze geschaffen.

20 In zunächst durchgeführten Arbeiten wurde anhand von transgenen *Physcomitrella*-Linien, die aus der Arbeit von Reutter (a.a.O., 1994) stammten, die langfristige Stabilität der Integration gezeigt. Die Expression der beispielhaft hierfür eingesetzten heterologen *npt II*- und *gus*-Gene konnte auch nach vier Jahren 25 noch nachgewiesen werden.

Die Bioreaktorkultur von *Physcomitrella* wurde optimiert. Es wurde ein Rührer entwickelt, der eine Zerkleinerung der Protomen bewirkt und somit die erforderliche Homogenität der Kultur 30 bei kontinuierlichen Umdrehungszahlen von 300 - 500 rpm gewährleistet. Hierdurch wurde eine standardisierte Probenentnahme möglich. Gleichzeitig wurde die zugeführte Luft gleichmäßiger in der Flüssigkultur verteilt. Unter diesen Bedingungen konnte gezeigt werden, daß Biomasse- und Proteinentwicklung ohne pH-

Regulation von außen gleich verlaufen wie mit pH-Regulation; diese ist somit überraschenderweise nicht notwendig. Es konnte unter semikontinuierlichen Bedingungen eine wöchentliche Biomasseproduktion von 500 mg Trockengewicht bzw. 22 mg Gesamtprotein pro Liter erzielt werden. Das bedeutet eine Steigerung der Biomasseproduktion um das fünffache gegenüber der herkömmlichen 5 l Glaskolbenkultur. Die Verringerung der Salzkonzentrationen des Knop-Mediums auf ein Zehntel führte zu ähnlichen Werten und somit zu einer Kostenreduktion.

10

Die Zugabe von 5mM Ammoniumtartrat beschleunigte durch Verkürzung der lag-Phase die Biomasseentwicklung. Mit der Zugabe von Ammoniumtartrat wurden gleichzeitig Kulturen erhalten, die fast ausschließlich Chloronemazellen umfaßten. Mit Hilfe der Durchflußzytometrie konnte für diese Kulturen gezeigt werden, daß die Zellen sich zu nahezu hundert Prozent in der G2/M-Phase des Zellzyklus befanden. Weitere physiologische Untersuchungen mit Auxin sowie Untersuchungen mit den differenzierungsspezifischen Mutanten call12 und call13 bestätigten dieses Ergebnis und führten zu dem Schluß, daß sich Caulonemazellen in der überwiegenden Zeit in der G1/G0-Phase und Chloronemzellen hauptsächlich in der G2/M-Phase befinden.

Mit dem 1'-Promotor aus Agrobakterien wurde ein Promotor auf eine mögliche Induzierbarkeit im Moos untersucht. Das Gen der β -Glucuronidase (*gus*) diente als Markergen. In transient transformierten Moosprotoplasten (Transformationsrate = 3×10^{-4}) konnte nach Induktion mit 5 μ M Indol-3-Essigsäure die Expression des *gus*-Gens beobachtet werden. In den Kontrollen konnte eine Expression in keinem Fall beobachtet werden.

30

Das Gen für die 121 Aminosäuren große Spleißform des humanen vasculären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF₁₂₁) wurde mit Transformationsraten von $0,5 \times 10^{-5}$ und $3,3 \times 10^{-6}$ in *Physcomitrella*

transferiert. Hierfür wurde das Gen hinter den konstitutiven 35S-Promotor und in den für Pflanzen geeigneten Transformationsvektor pRT99 kloniert. In einem zweiten Ansatz wurde zusätzlich die für das zugehörige humane ER-Transitpeptid kodierende Sequenz kloniert. Durch Southern-Analysen der erhaltenen stabilen Transformanten konnte die Integration der heterologen DNA nachgewiesen und die Art der Integration beschrieben werden. Northern-Analysen ergaben für diese Transformanten den Nachweis des nptII- und der beiden VEGF-Transkripte. Der Nachweis der Expression des VEGF₁₂₁ in den Mooszellen konnte mit der indirekten Immunfluoreszenz erbracht werden. Mit Hilfe des Konfokalen Laserscanning Mikroskops konnte das Protein eindeutig in den Zellen lokalisiert werden. Diese Untersuchungen ergaben für die Transformanten ohne Transitpeptid, daß das Protein insbesondere im Cytoplasma lokalisiert ist. In den Transformanten, die zusätzlich das Transitpeptid für das ER enthalten, ist das Protein in den Kernbereichen und in den Spitzenbereichen der apikalen Zellen - Orte mit sehr hohem ER-Anteil - zu finden. Durch die Anwendung von ELISA sowie zweier Funktionalitätstests auf das aus dem Kulturmedium gewonnene VEGF-Protein konnte die biologische Aktivität des erfindungsgemäß hergestellten heterologen Proteins nachgewiesen werden.

Material und Methoden:

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern im Text nicht anders erwähnt, in p.a. Qualität von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) sowie Sigma (Deisenhofen) bezogen.

Lösungen wurden in aufbereitetem, pyrogenfreiem Wasser, im weiteren Text als H₂O bezeichnet, aus einer Milli-Q Water System Wasseraufbereitungsanlage (Millipore, Eschborn) angesetzt.

Restriktionsendonukleasen, DNA-modifizierende Enzyme und molekularbiologische Kits wurden von den Firmen AGS (Heidelberg), Amersham (Braunschweig), Applied Biosystems (Weiterstadt), Biometra (Göttingen), Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim), Genomed (Bad Oeynhausen), New England Biolabs (Schwalbach-Taunus), Novagen (Madison, Wisconsin, USA), Pharmacia (Freiburg), Qiagen (Hilden) und Stratagene (Heidelberg) bezogen. Sie wurden, soweit nicht anders erwähnt, nach Herstellerangaben verwendet.

10

Vektoren und Konstrukte

Das Plasmid pCYTEXP-VEGF₁₂₁ ist ein Derivat von pCYTEXP1 (T.N. Belev et al., A fully modular vector system for the optimization of gene expression in *Escherichia coli*, Plasmid, 26, S. 147-150 (1991)), in dem die cDNA des humanen VEGF₁₂₁ für die Expression in *E. coli* integriert ist. Die cDNA des VEGF₁₂₁ wird aus pCYTEXP-VEGF₁₂₁ mit den Restriktionsendonucleasen Nde I und Sal I herausgeschnitten, gereinigt und "blunt end" in die Sma I-Schnittstelle von pRT101 (R. Töpfer et al., A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions, Nucleic Acids Res., 15, S. 5890 (1987)) zwischen den 35S-Promotor und die Polyadenylierungssequenz des CaMV kloniert. Mit Hin dIII wird die so erhaltene Kasette wiederum herausgeschnitten und in die Hin dIII Restriktionsschnittstelle des Transformationsvektors pRT99 kloniert. pRT99 verfügt neben einer multiplen Klonierungsstelle über das Neomycinphosphotransferase-Gen unter der Regulation des 35S-Promotors und der dazugehörigen Polyadenylierungssequenz aus dem CaMV (R. Töpfer et al., Versatile cloning vectors for transient gene expression and direct gene transfer in plant cells, Nucleic Acids Res., 16, S. 8725 (1988)). Dieses Gen vermittelt in stabil transformierten Pflanzen eine Resistenz gegen das Antibiotikum G418. Die Vermehrung der Plasmide erfolgt in dem *Escherichia coli* Stamm DH5α

(J. Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989)).

Aus dem ursprünglich für die Expression des VEGF₁₂₁ in Insektenzellen konstruierten Vektor pVE-121, der zusätzlich zu der VEGF₁₂₁-Sequenz die DNA umfaßt, die für das natürliche Transitpeptid codiert, welches in tierischen Zellsystemen die Sekretion über das endoplasmatische Reticulum in das Medium vermittelt (Fiebich et al., Synthesis and assembly of functionally active human vascular endothelial growth factor homodimers in insect cells, Eur. J. Biochem., 211, S. 19-26 (1993)), wird die cDNA durch die Restriktionsenzyme *Bam* HI und *Bgl* II herausgeschnitten und über pRT101 in pRT99 kloniert und überprüft.

Das Plasmid pNA201 ist ein Derivat des binären Vektors pBI101 (A.R. Jefferson et al., Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system, Plant Mol. Rep., 5, S. 387-405 (1987)). Es enthält als Selektionsmarker für Pflanzen das *nptII*-Gen unter dem Nopalinsynthase-Promotor. Das ebenfalls vorhandene *gus*-Gen wird durch den 1'-Promotor aus *Agrobacterium tumefaciens* reguliert. pNA201 eignet sich für die direkte Transformation von *Physcomitrella patens*.

Antikörper

Es werden zwei verschiedene Antikörper gegen das VEGF-Protein verwendet. Der erste Antikörper ist ein Kaninchen-Anti-VEGF-Antikörper und gegen ein synthetisches Peptid, welches den Aminosäuren 1-20 des nativen humanen VEGF entspricht, gerichtet (Fiebich et al., a.a.O. (1993)). Der zweite Antikörper ist ein monoklonaler, gegen das humane VEGF₁₂₁ Protein gerichteter Maus-Antikörper (R&D Systems, Wiesbaden).

Pflanzenmaterial

Eingesetzt wird der Wildtypstamm des Laubmooses *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G., der aus der Sammlung des Arbeitsbereiches Genetik im Institut für Allgemeine Botanik der Universität Hamburg stammt. Er geht auf den von H.L.K. Whitehouse in Gransden Wood, Huntingdonshire (England) gesammelten Stamm 16/14 zurück, der aus einer Spore subkultiviert wurde.

Der Wildtypstamm wird entweder in Flüssigkultur mit Knop-Medium (R. Reski und W.O. Abel, Induction of budding on chloronemata and caulonemata of the moss, *Physcomitrella patens*, using isopentenyladenine, Planta, 165, S. 354-358 (1985)) oder auf Knop-Festmedium mit 1% Oxoid-Agar (Unipath, Basingstoke, England) kultiviert. Die Flüssigkultur wird wie bei Reski (a.a.O., 1990) beschrieben durchgeführt.

Bioreaktorkultur

Zur Massenzucht wird Pflanzenmaterial in einem 7 l-Doppelwand-Glasrundkolben Bioreaktor (Applikon Biotek, Knüllwald) kultiviert. Abluftkühler, Belüftungsrohr, pH-Elektrode (Conducta, Gerlingen), Temperaturfühler, Rührwerk, Probenentnahmerohr sowie die Zuflüsse für Säure, Lauge und Medium werden bei diesem Bioreaktorsystem durch Bohrungen im Deckel von oben in den Kulturraum eingeführt. Die Kultivierung erfolgt bei 25°C und wird durch ein entsprechend eingestelltes Wasserbad, welches mit dem Doppelmantel verbunden ist, geregelt. Bei den Versuchsdurchgängen, die mit pH-Regelung durchgeführt werden, wird dieser durch die Titrationseinheit konstant auf pH 5,8 gehalten. Temperaturmessung und pH-Regelung werden durch den Biocontroller ADI 1030 (Applikon Biotek, Knüllwald) gewährleistet. Die Rührerdrehzahl kann durch den Motorregler ADI 1012 (Applikon Biotek, Knüllwald) variiert werden. Das Kulturmedium wird konstant mit 1 bar Luft über ein poröses Einblaselement belüftet. Um Keimfreiheit im Kulturgefäß zu gewährleisten, werden alle Zu- und

Abluftleitungen mit Sterilfiltern (Midisart, 0,2 µm; Sartorius, Göttingen) versehen. Die Bioreaktorkultur wird in einem Kulturschrank mit Beleuchtung von der Seite (Weißlicht; Osram L 40W/20; max. 100 µmols⁻¹m⁻²) durchgeführt. Das Animpfen der Kulturen erfolgt mit 0,5 -1g FG Pflanzenmaterial pro Liter Bioreaktorkultur unter sterilen Bedingungen. Das Probenentnahmerohr befindet sich auf Höhe des Rührers, wodurch unter Rühren eine gleichmäßige Probenentnahme gewährleistet wird. Kleine Probenmengen (< 100 ml) werden mit einer sterilen Spritze über einen Luer Lock-Anschluß genommen, für die Entnahme großer Probenvolumina wird beispielweise eine Schlauchpumpe Typ 302/3A mit Kopf 501 RI (Sartorius, Göttingen) verwendet.

Durch die Zugabe von 5 mM Ammoniumtartrat zum Knop-Medium werden Chloronemakulturen des Wildtyps erzeugt.

Unter Anwesenheit des Stabilisators Polyvinylpyrrolidon (PVP) im Kulturmedium kann die Ausbeute an freigesetztem biologisch aktiven heterologen Protein deutlich gesteigert werden.

Die während der Protonemaentwicklung stattfindende Differenzierung des Caulonemas kann durch exogene Zugabe von physiologischen Auxinmengen induziert und verstärkt werden, wobei Konzentrationen von z.B. 5 µmol/l Indol-3-essigsäure (IAA) geeignet sind.

Für die Flüssigkultur von Transformanten unter Selektionsdruck werden dem Knop-Medium 50 mg/l des Antibiotikums G418 (Calbiochem, Bad Soden) zugegeben. Hierzu werden die Kulturen alle zehn Tage direkt vor dem Zerkleinern mit sterilen 100 µm Sieben (Wilson Sieves, Nottingham, England) abfiltriert und in mit Selektionsmedium gefüllten Erlenmeyerkolben überführt.

Für Nährsalzversuche wird das Knop-Medium im Verhältnis 1:10 mit H₂O verdünnt.

Transformation

- 5 Als Transformationsmethode wird der PEG-vermittelte direkte DNA-Transfer in Protoplasten nach Reutter und Reski (a.a.O., 1996) gewählt. Bei jeder Transformation werden 50 µg Plasmid-DNA pro 3×10^5 Protoplasten eingesetzt. Die Regeneration der Protoplasten und die Selektion auf stabile Transformanten erfolgt, soweit
10 nicht anders erwähnt, nach Reutter und Reski (a.a.O., 1996).

Indirekte Immunfluoreszenz

Puffer: MSB: 100 mM PIPES; 5-10 mM EGTA, 5 mM MgSO₄, pH 6,8

F-MSB: MSB + 5% DMSO

- 15 E-MSB: MSB + 5% DMSO + 5% Nonidet

W-MSB: MSB 1:2 mit H₂O verdünnt (Waschpuffer)

Enzymlösung: 1% Cellulase, 1% Pektinase, 2% Driselase in MSB, pH
5,6 (alle Sigma, Deisenhofen)

20

- Zur Fixierung der Moosprotonemen werden diese in 1,25% Glutaraldehyd in F-MSB (v/v) für maximal 10 Minuten inkubiert und kurz in W-MSB gewaschen. Anschließend wird mit 2% Paraformaldehyd in MSB (v/v) für 40 min inkubiert und 3x mit W-MSB gewaschen (1x
25 spülen; 2x 5 min waschen).

- Die Reduktion freier, nicht auswaschbarer Aldehyde erfolgt durch Zugabe von MSB und einer Spatelspitze festem Borhydrid mit einer Inkubationszeit von 10 min. Das Borhydrid wird durch dreimaliges
30 Waschen mit W-MSB entfernt.

- Im nächsten Schritt werden die Zellwände durch die Zugabe der Enzymlösung für 10 min durchlässig gemacht. Die enzymatische Reaktion wird durch eine pH-Änderung (MSB, pH 6,8) abgestoppt.
35 Es wird erneut 3x mit W-MSB gewaschen.

Durch Inkubation mit einer Detergenzlösung über einen Zeitraum von 120 min werden Chlorophylle extrahiert. Die Lösung wird durch dreimaliges Waschen mit W-MSB wieder entfernt.

5 Nach dieser Vorbereitung können die Moosprotonemen mit dem primären Antikörper (Anti-VEGF; 1/50 verd.) inkubiert werden. Dies erfolgt für 45 min bei 37°C. Nach dreimaligem Waschen mit W-MSB wird der markierte sekundäre Antikörper (Anti-Kaninchen oder Anti-Maus; 1/30 verd.; mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC)
10 (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) markiert) für 45 min bei 37°C zugegeben. Zusätzlich zu den 3 Waschschritten wie oben, wird einmal mit W-MSB + 0,1 % Triton gewaschen. Anschließend werden die Protonemen in W-MSB aufgenommen und mindestens über Nacht bei 4°C gelagert.

15

Die Auswertung erfolgt mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops (CLSM) des Typs TCS 4D (Leica Lasertechnik, Heidelberg) und der Software Scanware 5,0 (Leica Lasertechnik, Heidelberg).

20

Die Proben werden für die Untersuchung mit dem CLSM auf einem Objektträger in die "Mounting-solution" (Dabco, Sigma, Deisenhofen) gebracht. Die Anregung des an den sekundären Antikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffes FITC erfolgt mit Hilfe eines
25 Argon-Krypton Lasers bei einer Wellenlänge von 488 nm. Das FITC emittiert das Licht mit einer Wellenlänge von 528 nm.

ELISA-Test

Die qualitative und quantitative Bestimmung des in entsprechend transformierten Moospflanzen gebildeten VEGF-Proteins im Kultur-
30 medium erfolgt nach herkömmlichen Verfahren mittels ELISA-Test unter Verwendung der oben beschriebenen Antikörper. Eine Menge von 200 µl Kulturmedium wird direkt dem ELISA-Test zugeführt.

Funktionalitätstests

Die Überprüfung der biologischen Aktivität des rekombinant gebildeten und aus dem Kulturmedium gewonnenem VEGF erfolgt unter Anwendung des 'Mitogenic Assay' (Miyazono et al., Purification and properties of an endothelial cell growth factor from human platelets, J. Biol. Chem., 262, S. 4098-4103 (1987)) sowie des 'Day-13 chorioallantoic-membrane angiogenesis Assay' (Wilting et al., A morphological study of the rabbit corneal assay, Anat. Embryol., 183, S. 1167-1174 (1991)). Zuvor wird das Kulturmedium ultrafiltriert, lyophilisiert und anschließend in Puffer resuspendiert. Gewünschtenfalls kann ein weiterer Reinigungsschritt über eine Kationensäule erfolgen.

Induktion des 1'-Promotors

Die Induzierbarkeit des 1'-Promotors durch Auxin wird mit 5 µmol/l Indol-3-essigsäure (IAA) getestet. 100 µl Protoplasten aliquots eines Transformationsansatzes mit pNA201 werden fünf Tage nach der Transformation in die Vertiefungen einer 96-Loch-Mikrotiterplatte (Nunc, Wiesbaden) überführt. Die Protoplastensuspensionen werden mit IAA (Endkonz. = 5 µM) für fünf Stunden inkubiert. Die Auswertung der Induktionsversuche erfolgt direkt im Anschluß an die Inkubationszeit mit Hilfe des qualitativen β-Glucuronidase-Nachweises.

Qualitativer Nachweis der β-Glucuronidase

Die β-Glucuronidaseaktivität wird mit einem qualitativen Test bestimmt (A.R. Jefferson, Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system, Plant Mol. Rep., 5, S. 387-405 (1987)).

Substratpuffer: 50 mM K₃Fe(CN)₆ 50 mM Na₂HPO₄
30 50 mM K₄Fe(CN)₆ 1 % (v/v) Triton X-100
50 mM NaH₂PO₄ 10 mM EDTA, pH 7,0
4 mg/ml PVP (MG 10000)

Färbelösung: 12,5 mg 5-Bromo-4-chloro-3-inoyl-glucoronide-acid
(Biomol, Hamburg) gelöst in 250 µl N,N-Dimethylformamid / 50 ml Substratpuffer

- 5 Moosprotonemen und -protoplasten in Knop- bzw. Regenerationsmedium werden in gleichem Volumen Färbelösung bei 37°C bis zu 72 Stunden inkubiert und direkt im Anschluß unter Verwendung eines Mikroskops ausgewertet.

10

Ergebnisse

Homogenität der Bioreaktor-Kultur - Probenentnahme

- Bei Zellkulturen ist eine standardisierte Probenentnahme nur aus homogenen Kulturen gewährleistet. Das Wachstum des Protonemas zu
15 langen Zellfäden führt nach längerer Kulturdauer häufig zu Zellaggregaten und somit zur inhomogenen Verteilung des Pflanzenmaterials in den Flüssigkulturen. Zur Vermeidung dieser Aggregatbildung wird in bestimmten Zeitintervallen - im Bioreaktor ab Tag 10 alle zwei Tage und in der Schüttelkultur alle 12
20 Tage - eine Zerkleinerung der Protonemen durch Verwendung von Rührern/Homogenisatoren mit hohen Umdrehungszahlen erreicht. Um kontinuierliche Bedingungen im Bioreaktor bei gleichzeitig standardisierter Probenentnahme auch über eine lange Kulturdauer zu ermöglichen, empfiehlt sich die Modifikation eines Turbinenrührers mit drei Rührblättern durch Umfunktionieren der Rühr-
25 blattränder mittels Anschleifen zu Scherblättern. Hierdurch ist es möglich, durch ständiges "Rühren" mit 300 - 500 rpm homogene Bioreaktorkulturen zu fahren.

- 30 Die Entwicklung der Biomasse (in TG [mg/l]) in einem Zeitraum von 35 Tagen (840 h) bei 500 rpm ist in den Kontrollkulturen mit dem Turbinenrührer die gleiche wie in Bioreaktorkulturen, die mit dem Scherblattrührer gerührt wurden.

Die Homogenität der Kulturen wird durch den Vergleich von jeweils sechs parallelen Probeentnahmen beurteilt. Als Vergleichsparameter wird das Trockengewicht von Pflanzenmaterial aus 100 ml Probenvolumen bestimmt. Bei Verwendung eines unveränderten Turbinenrührers nimmt die Standardabweichung mit dem Anstieg der Konzentration der Biomasse zu. Das Rühren mit dem Scherblattrührer hat zur Folge, daß die Standardabweichungen der Probenentnahmen gleich gering bleiben. Dies läßt den Schluß zu, daß mit dem modifizierten Rührer über einen Zeitraum von 35 Tagen eine gleichmäßig homogene Kultur erhalten werden kann.

Untersuchungen zur Induzierbarkeit des 1'-Promotors

In dem Plasmid pNA201 liegt der 1'-Promotor als Kontrollelement vor dem *gus*-Gen. Für Induzierungsversuche im Moos ist der bekannte β -Glucuronidase-Test als Expressionsnachweis geeignet. In Versuchen mit transgenem Tabak wird beobachtet, daß der 1'-Promotor in Gewebe mit hohem Auxingehalt zur Expression der β -Glucuronidase führt, weshalb für diesen Promotor eine Auxinabhängigkeit vermutet wird. Die Induzierbarkeit des 1'-Promotors durch Auxin in *Physcomitrella patens* wird in transient transformierten Protoplasten untersucht.

Die Transformationsansätze werden mit (5 h) und ohne Inkubation mit 5 μ M Indol-3-essigsäure (IAA) dem β -Glucuronidase-Test unterzogen. In den Kontrollen ohne Zugabe von IAA werden bei der mikroskopischen Auswertung in keinem Ansatz blaue Protoplasten gefunden. Die Auswertung der Protoplasten, die mit Auxin inkubiert werden, ergibt dagegen den Nachweis der Expression des *gus*-Gens. Anhand der blauen Protoplasten wird eine Transformationsrate von 3×10^{-4} erzielt. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf die Induzierbarkeit des 1'-Promotors in transient transformierten Moosprotoplasten durch das Pflanzenhormon Auxin.

Erstellung der Vektoren für die VEGF-Transformationen

Für die Transformationen der cDNA des VEGF₁₂₁ ohne Leadersequenz, im weiteren VEGFC genannt, und der cDNA des VEGF₁₂₁ mit Leadersequenz, im weiteren VEGFP genannt, in *Physcomitrella* ist es
5 notwendig, die Sequenzen zwischen eine für Pflanzen geeignete Promotor/Terminierungs-Einheit zu klonieren. Hierfür werden der 35S CaMV-Promotor und das dazugehörige Polyadenylierungssignal gewählt. Die entsprechend vorbereiteten cDNA-Sequenzen des VEGF werden in die *Sma* I Restriktionsschnittstelle der multiplen
10 Klonierungsstelle des Vektors pRT101 kloniert.

Mit einem aus dem Endbereich des 35S-Promotors abgeleiteten Primer werden die entstandenen Vektoren (pRT101VEGFC 3 und VEGFP 21) sequenziert und die korrekte Integration zwischen Promotor
15 und Polyadenylierungsstelle überprüft.

Die entstandenen Kassetten werden mit dem Restriktionsenzym *Hin* dIII herausgeschnitten und in den eigentlichen Transformationsvektor pRT99 in die *Hin* dIII Schnittstelle kloniert (pRT99VEGFC
20 3 und VEGFP 21). Die Orientierung der Kassetten zur NPTII-Kassette kann über eine Restriktion mit *Sma* I und *Hinc* II ermittelt werden. Bei einer Promotor zu Polyadenylierungssignal-Orientierung erhält man ein 5250 (VEGFC) bzw. 5380 bp (VEGFP) großes Fragment, bei umgekehrter Orientierung ein 1100
25 (VEGFC)/1230 (VEGFP) sowie ein 4150 bp (VEGFC und P) großes Fragment. Die Restriktionsanalysen lassen nur ein 5250/5380 bp-Fragment erkennen, der Einbau der VEGFC/P-Kassetten ist somit in Promotor zu Polyadenylierungssignal-Orientierung zum *nptII*-Gen des pRT99 erfolgt.

30

VEGFC-Transformationen in *Physcomitrella*

Die absolute Transformationsrate für die Transformation des VEGFC-Konstrukt in Wildtyp-Protoplasten beträgt bei konstanter

Stabilität der Transformanten nach mehrfachem Wechsel von Knopmedium zu Selektionsmedium $0,5 \times 10^{-5}$.

Nachweis der Integration des transformierten Plasmids

5 Der Nachweis der erfolgten Integration ins pflanzliche Genom wird unter Anwendung der Southern-Hybridisierung erbracht. Als Sonden werden einerseits ein Nco I-Fragment des npt II-Gens aus pRT99 und andererseits ein Nde I/Sal I-Fragment des VEGFC aus pCYTEXP-VEGF₁₂₁ verwendet.

10

Die in der ungespaltenen Gesamt-DNA der Transformanten detektierten Signale belegen die erfolgreiche Integration der Plasmid-DNA in das pflanzliche Genom. Der Erhalt der gesamten 35S-VEGFC-PolyA-Kassette auch nach der Integration wird durch die Restriktion mit Hin dIII untersucht. Mit diesem Restriktionsenzym wird, 15 sofern die Kassette bei der Integration intakt geblieben ist, ein 1100 bp großes Fragment aus der Gesamt-DNA herausgespalten.

Das Hybridisierungsmuster mit der VEGFC-Sonde zeigt für alle 20 Transformanten ein Fragment von 1100 bp. Damit wird der Nachweis der Integration der vollständigen VEGFC-Expressionseinheit, die Voraussetzung für die korrekte Transkription und Expression des VEGF₁₂₁ im Moos ist, erbracht.

25 Nachweis der Transkription der heterologen Gene

Die Transkripte der heterologen Gene VEGFC und NPTII aus den Transformanten werden mit dem nichtradioaktiven DIG-Detektionssystem unter Verwendung der VEGF- und der NPT II-Sonden nachgewiesen. Die Größen für die im Fluorogramm detektierten Transkripte liegen mit 760 Nukleotiden für das VEGFC-Transkript und 1100 Nukleotiden für das NPT II-Transkript in der jeweils erwarteten Größenordnung. In der WT-Kontrolle wird 30 erwartungsgemäß keines der beiden heterologen Transkripte detektiert.

Analyse der Transformanten mit humanem Transitpeptid

Mit dem PEG-vermittelten DNA-Transfer von 50 µg pRT99P 21 Plasmid-DNA pro Transformationsansatz werden Transformanten erzeugt, die auf Selektionsmedium dauerhaft stabil sind. Daraus
5 ergibt sich eine stabile Transformationsrate von $3,3 \times 10^{-6}$.

Nachweis der Integration des transformierten Plasmids

Der Nachweis der Integration für die zuvor beschriebenen Transformanten mit Transitpeptid wird wie oben dargelegt mit dem
10 Verfahren der Southern-Hybridisierung unter Verwendung der beschriebenen Sonden erbracht und die Hybridisierung von mit *Hin* dIII gespaltener Gesamt-DNA mit der VEGF-Sonde läßt ein 1230 bp großes Fragment erkennen: der Nachweis der Vollständigkeit der integrierten 35S-VEGFP-PolyA-Kassette.

15

Nachweis der Transkription der heterologen Gene

Mit dem oben dargelegten Verfahren können sowohl NPTII- als auch VEGFP-Transkripte nachgewiesen werden.

20 Nachweis des humanen VEGF₁₂₁ in transgenen Mooszellen mit dem Konfokalen Laserscanning Mikroskop

Bei dieser Methode wird das zu untersuchende Protein direkt in fixierten Zellen markiert. Die Auswertung erfolgt mit dem Konfokalen Laserscanning Mikroskop, mit welchem ein verbessertes
25 Auflösungsvermögen als mit dem normalen Lichtmikroskop erzielt wird.

In den VEGFC-Transformanten sollte das rekombinante VEGF₁₂₁-Protein, wenn es in den Mooszellen nachweisbar ist, im Cytoplasma
30 akkumulieren. In den VEGFP-Transformanten sollte es im ER-System nachzuweisen sein, wenn das Transitpeptid als Signal im Moos funktioniert.

Mit der Methode der indirekten Immunfluoreszenz und einer computergestützten Auswertung mit dem Konfokalen Laserscanning Mikroskop ist es gelungen, die Expression des humanen VEGF₁₂₁ in transgenen Mooszellen nachzuweisen. Darüber hinaus wird gezeigt,
5 daß mit dem dazugehörigen humanen Transitpeptid der VEGF₁₂₁ in transgenem Moos erfolgreich in das endoplasmatische Retikulum transportiert wird.

Untersuchung des Vorhandenseins von VEGF im Kulturmedium

10 Ein Aliquot des Kulturmediums in Gegenwart von PVP mit einem Volumen von 200 µl wird mittels ELISA-Test untersucht und zeigt, daß die mit der Expressionskassette einschließlich Transitpeptid-kodierender Sequenz transformierten Moospflanzen in der Lage sind, VEGF in das Medium freizusetzen. Die positiven Ergebnisse
15 lassen auf ein funktionelles VEGF-Protein schließen.

Untersuchung der biologischen Aktivität

Beide zur Überprüfung der biologischen Aktivität des in das Kulturmedium freigesetzten VEGF-Proteins eingesetzten Tests
20 liefern positive Resultate und belegen, daß erfindungsgemäß hergestelltes VEGF aus dem Kulturmedium mit der erwünschten biologischen Aktivität gewonnen werden kann.

Patentansprüche

5

1. Verfahren zur Herstellung heterologer proteinöser Substanzen in pflanzlichen Materialien, **dadurch gekennzeichnet**, daß als pflanzliches Material Moosgewebe verwendet wird und die Gewinnung der hergestellten proteinösen Substanzen aus dem Kulturmedium im wesentlichen ohne Aufbrechen der produzierenden Gewebe oder Zellen erfolgt.

10

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die in das Kulturmedium freigesetzte proteinöse Substanz biologisch aktiv ist.

15

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein Kulturmedium verwendet wird, welches im wesentlichen frei von Zuckern, Vitaminen und Phytohormonen bzw. funktionellen Fragmenten derselben ist.

20

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Moosgewebe ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus Laubmoosen und Lebermoosen.

25

5. Verfahren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Moosgewebe aus Laubmoosen aus der Gruppe bestehend aus *Physcomitrella*, *Funaria*, *Sphagnum* und *Ceratodon* ausgewählt wird.

30

6. Verfahren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Moosgewebe aus Lebermoosen aus der Gruppe bestehend aus *Marchantia* und *Sphaerocarpos* ausgewählt wird.

35

**Attached is a second copy of English translation of International Application No.
PCT/DE00/03374 filed on 27 September 2000 in compliance with the requirements
of 35 U.S.C. § 154(d)(4).**

Method for the production of proteinaceous substances

The present invention generally relates to the field of the production of proteinaceous substances in plant material. In particular, the invention relates to a novel method for the production of desired proteinaceous substances in mosses.

The exploitation of biotechnological methods for production purposes is an important possibility for man of producing substances which cannot be produced economically, if at all, by other routes, for example by chemical synthesis, and of which insufficient amounts are available naturally to act as raw materials. Even though over 10 000 plant secondary metabolites are known, only few of these compounds are produced on an industrial scale with the aid of plant cell cultures. These substances are predominantly pharmaceutically active secondary metabolites. Examples which may be mentioned are a) berberin (production on the 4 000 l scale), which has a bacteriostatic and fungicidal action (Y. Fujita and M. Tabata, in: Plant tissue and cell culture, plant science; Vol. 3, p. 169, C.E. Green et al. (Ed.), A.R. Liss Inc., New York (1987)), b) shikonin (750 l scale) which has an antibiotic and antiinflammatory action (M. Tabata and Y. Fujita, in: Biotechnology in plant science; p. 207-218, P. Day et al. (Ed.), Academic Press, Orlando (1985)), and c) paclitaxel (75 000 l scale), better known under the name taxol, which has antitumor action (M. Jaziri et al., *Taxus* sp. cell, tissue and organ cultures as alternative sources for taxoids production: a literature survey, Plant Cell Tiss. Org. Cult., 46, pp. 59-75 (1996)).

A further important biotechnological method, in which plant cell cultures are exploited, is the biotransformation of digitoxin to digoxin, a cardiac and

circulation drug. This stereospecific hydroxylation reaction is carried out successfully in bioreactor cultures of *Digitalis lanata* (E. Reinhard and W. Kreis, Kultivierung von pflanzlichen Zellen im Bioreaktor [Plant cell culture in the bioreactor], Bio. Engin., 5, pp. 135-136 (1989)) in high yields. An up-to-date and extensive review of the use of plant cell cultures in biotechnology can be found in H.-P. Mühlbach, Use of plant cell cultures in biotechnology, Biotechnol. Annu. Rev., 4, pp. 113-176 (1998).

The development of genetic transformation methods for higher plants at the beginning of the eighties made it possible considerably to increase the productivity of plants for specific secondary constituents by transforming the genes for specific key enzymes of the metabolic pathways in question. Not only transgenic intact plants but also plant cell cultures were exploited. Examples which may be mentioned are the overexpression of a bacterial lysine decarboxylase in transgenic root-hair cultures of *Nicotiana tabacum*, which increased the yields of the biogenic amines Cadaverin and Anabasin by a factor of up to 14 (J. Berlin et al., Genetic modification of plant secondary metabolism: Alteration of product levels by overexpression of amino acid decarboxylases, in: Advances in Plant Biology, Studies in Plant Science, Vol. 4, pp. 57-81, D.D.Y. Ryu and S. Furasaki (Ed.), Elsevier, Amsterdam (1994)).

However, the possibility of transferring DNA into plants not only opened up quantitative and qualitative alterations of plant constituents; in addition, plants and plant cell cultures became more interesting for the production of heterologous proteins (A.S. Moffat, High-Tech plants promise a bumper crop of new products,

Science **256**, pp. 770-771 (1992)), two different approaches being chosen in principle.

One approach comprises the production of heterologous proteins in transgenic intact plants. Besides the production of antibodies in transgenic tobacco plants (J.K.-C.Ma et al., Generation and assembly of secretory antibodies in plants, Science **268**, pp. 716-719 (1995)), the expression and correct processing of human serum albumin both in transgenic tobacco plants and in transgenic potato plants has been described (P.C. Sijmons et al., Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants, Bio/Techn., **8**, pp. 217-221 (1990)). Human epidermal growth factor (hEGF) was also expressed in transgenic tobacco plants (A.-H. Salmanian et al., Synthesis and expression of the gene for human epidermal growth factor in transgenic potato plants, Biotechnol. Lett., **18**, pp. 1095-1098 (1996)). However, other plants were also used. Leu-enkephalin was produced successfully using *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* (E. Krebbers and J. Vandekerckhove, Production of peptides in plant seeds, Tibtech., **8**, pp. 1-3. (1990)). Furthermore, transgenic *Vigna unguiculata* plants were used for the expression of chimeric viral particles which act as vaccines (K. Dalsgaard et al., Plant-derived vaccine protects target animals against a viral disease, Nat. Biotech., **15**, pp. 248-252 (1997)).

A principal disadvantage when using intact plants as those described above by way of example is the necessity of growing them, which is time-consuming and expensive, and the large cultivation area which is required for industrial-scale production. Moreover, the isolation of the desired target substances from intact plants usually requires complex process steps, in particular when the consistency and quality of the products must meet high

requirements, as is the case with substances to be employed for pharmaceutical or nutritional purposes.

In the second approach, transgenic tobacco cell cultures
5 were exploited for the production of antibodies.
Described are, for example, the expression of antibodies
and their secretion into the medium (N.S. Magnuson et
al., Enhanced recovery of a secreted mammalian protein
from suspension culture of genetically modified tobacco
10 cells, Prot. Expr. Pur., 7, pp. 220-228 (1996)). Since
the purification of heterologous proteins from cells is
complicated, secretion of the target protein into the
medium constitutes a marked improvement. Moreover, the
production of recombinant pharmaceutically relevant
15 proteins in cell cultures is also of interest from the
safety point of view since the transgenic plant cells can
be grown exclusively in bioreactors and need not be
released. The necessary mass culture was made possible by
the development of bioreactors for heterotrophic plant
20 cell cultures on a larger scale (for example M.L. Shuler
et al., Bioreactor engineering as an enabling technology
to tap biodiversity: The case of taxol., Ann. N. Y. Acad.
Sci., 745, pp. 455-461 (1994)).

25 The principal disadvantages of this second approach, in
which plant suspension cultures are used, are the low
growth rate, the relatively slow formation of secondary
metabolites, the inhibition of product formation at high
cell densities and, as a consequence, low productivity
30 per volume, the formation of aggregates and cell wall
constituents, and the increased sensitivity of the cells
to shear forces. It must also be taken into account that
complex media with a multiplicity of constituents, some
of which are expensive, must always be provided when
35 using heterotrophic cell cultures. However, the most
serious disadvantage to be mentioned is the occurrence of

somaclonal variations in plant *in vitro* cell cultures, which bring about quantitative and qualitative changes in the production of heterologous proteins (see, for example, M.G.K. Jones and K. Lindsey, Plant
5 biotechnology, in: Molecular biology and biotechnology, J.M. Walker and E.W. Gingold (Eds.), 2nd Ed., Royal Soc. of Chem., Burlington House, London (1988). Heterogeneity of the products formed and of their functional properties cannot be accepted, in particular in connection with the
10 production of pharmaceuticals and other desired substances whose official approval demands reliable quality assurance and a standardized production method.

The object of the present invention is therefore to
15 provide a method for the standardized production of heterologous proteinaceous substances in plant materials which essentially eliminates not only the above-described disadvantages of using intact plants, but also the disadvantages of using cell culture systems.

20 This object is achieved in accordance with the invention by providing a novel method for the production of heterologous proteinaceous substances in plant material in which fully differentiated moss plants are grown under
25 standard conditions and the proteinaceous substances produced are obtained from the culture medium essentially without disrupting the producing tissues or cells.

The term "proteinaceous substance" as used herein
30 encompasses peptides, polypeptides and proteins and also fragments of these which are suitable in particular for diagnostic, clinical, pharmaceutical and nutritional purposes. Also encompassed are those molecules which have peptide bonds and which are translated by plant material.

In a preferred embodiment of the present invention, the desired heterologous proteinaceous substance is released into the culture medium in its biologically active form.

5 The term "biologically active" as used in the present description means that the target substances provided with this attribute have the functional properties desired or required for the respective purpose. If, for example, it is desired to produce antibodies, the protein
10 produced, or a functional fragment thereof, is biologically active when it is capable of establishing the expected specific binding with the antigen. It is obvious to the skilled worker that the complete protein is not always required for such purposes, but that it is
15 possible to search for epitopes or low-molecular-weight structures which ensure the desired biological activity or functionality. For example, an enzyme is biologically active when it is capable of converting its target substrate.

20

In a further preferred embodiment of the invention, the plant material is grown in the form of intact moss plants in a culture medium which is essentially free from sugars, vitamins and phytohormones or functional
25 fragments of these.

The method according to the invention allows the possibility of growing intact and fully differentiated plants under photoautotrophic conditions which can be
30 standardized, i.e. without requiring the addition of sugars, vitamins and phytohormones and the like, as is required in prior-art heterotrophic suspension cell culture systems. Because an inexpensive and simple culture medium is used, the steps of obtaining and
35 purifying the desired target substances are facilitated considerably.

The plant material to be employed in the method according to the invention is preferably an intact moss plant selected from the group of the mosses, including
5 liverworts, with species from the genera *Physcomitrella*, *Funaria*, *Sphagnum* and *Ceratodon*, and also *Marchantia* and *Sphaerocarpos* being especially preferably employed. The method according to the invention is most preferably carried out using the moss *Physcomitrella patens*.

10

In a further preferred embodiment, the nucleic acid construct used for the transformation encodes not only the desired proteinaceous substance, but also a transit peptide for secreting the substance from the host cell
15 into the culture medium. Any of the autologous and heterologous nucleic acid sequences known to the skilled worker can be employed in accordance with the invention and can be used for generating an expression cassette for transforming the producer tissue. The use of signal
20 peptides for the endoplasmic reticulum or cellular transport is especially preferred.

Work carried out for the present invention demonstrates that the above-described problem of somaclonal variation,
25 which is encountered in cell cultures, does not exist in photoautotrophic liquid cultures of mosses. Furthermore, the mosses used in accordance with the invention have the advantage over other systems of a clear sequence of precisely defined differentiation steps (chloronema,
30 caulonema, buds, gametophores), which can be influenced by adding plant hormones (indole-3-acetic acid induces caulonema development, isopentenyladenine induces the development of buds) (see, for example, N.W. Ashton et al., Analysis of gametophytic development in the moss,
35 *Physcomitrella patens*, using auxin and cytokinin resistant mutants, *Planta*, **144**, pp. 427-435 (1979)).

Directed differentiation-specific expression of heterologous proteins in bioreactor cultures is therefore made possible, and a synchronously dividing, pure and thus homogeneous chloronema culture is especially preferably suitable in accordance with the invention owing to its controllable uniform protein production in the bioreactor and its suitability for the use of hormone-dependent or differentiation-specific promoters.

10 In addition to such an expression system, an inducible promoter system may also be used in accordance with the invention, in particular for the production of proteins which have a short half-life or which are cytotoxic, the *Agrobacterium tumefaciens* 1'-promoter being used especially preferably.

The cultivation of mosses proposed in accordance with the invention for the production of heterologous proteins under economical aspects can be effected for example by using *Physcomitrella* in volumes in the order of magnitude of from 20 ml to over 6 l up to 10 l and above in shake cultures or in aerated glass containers (see, for example, R. Reski, Zell- und molekularbiologische Untersuchungen der cytokinin-induzierbaren Gewebedifferenzierung und Chloroplastenteilung bei *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G., [Cell- and molecular-biological studies of the cytokinin-inducible tissue differentiation and chloroplast division in *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G.], Ph.D. thesis, University of Hamburg (1990)). Since this is a culture of differentiated photoautotrophic plants, the medium needs neither supplementation with plant hormones nor vitamins nor sugars. In comparison with the complex media required, for example, for animal cell cultures, the costs are lower by a factor of 100. It has emerged in accordance with the invention that the yield of

biologically active heterologous protein in the culture medium can be increased by a factor of 35 in the presence of PVP, which is why the use of PVP in the culture medium is preferred in the method according to the invention.

5

Detailed information on culturing further mosses which are suitable in accordance with the invention such as, for example, *Leptobryum pyriforme* and *Sphagnum magellanicum* in bioreactors is described in the prior art (see, for example, E. Wilbert, Biotechnologische Studien zur Massenkultur von Moosen unter besonderer Berücksichtigung des Arachidonsäurestoffwechsels [Biotechnological studies concerning the mass culture of mosses with particular consideration of the arachidonic acid metabolism], Ph.D. thesis, University of Mainz (1991); H. Rudolph and S. Rasmussen, Studies on secondary metabolism of *Sphagnum* cultivated in bioreactors, Crypt. Bot., 3, pp. 67-73 (1992)). Especially preferred for the purposes of the present invention is the use of

10

20 *Physcomitrella*, in particular since all of the usual molecular-biological techniques are established for this organism (for a review see R. Reski, Development, genetics and molecular biology of mosses, Bot. Acta, 111, pp. 1-15 (1998)).

25

Suitable transformation systems were developed for the biotechnological exploitation of *Physcomitrella* for the production of heterologous proteins. For example, successful transformations were carried out by direct DNA transfer into protonema tissue using the particle gun.

30

The PEG-mediated DNA transfer into moss protoplasts was also successful. This transformation method has been described repeatedly for *Physcomitrella* and leads both to transient and to stable transformants (see, for example,

35 K. Reutter and R. Reski, Production of a heterologous protein in bioreactor cultures of fully differentiated

moss plants, Pl. Tissue culture, @ Biotech., 2, pp. 142-147 (1996)).

Although the present invention is principally suitable
5 for the production of any proteinaceous substance, the production of a pharmaceutically relevant protein will be demonstrated hereinbelow with reference to the human vascular endothelial growth factor (VEGF).

10 VEGF was first isolated by N. Ferrara and W.J. Henzel (Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells, Biochem. Biophys. Res. Commun., 161, pp. 851-858 (1989)) and characterized as regulatory factor for the
15 controlled angiogenesis and endothelial cell division under normal physiological conditions (N. Ferrara et al., The vascular endothelial growth factor family of polypeptides, J. Cell. Biochem., 47, pp. 211-218 (1991)). The authors also demonstrated that this growth factor
20 acts highly specifically on vascular endothelial cells and is inactive for other cell types. VEGF is a homodimeric glycoprotein linked by disulphide bridges. Four different forms of human VEGF are known. The four isoforms are 121, 165, 189 and 206 amino acids in length
25 and are formed by alternative splicing of VEGF RNA. VEGF₂₀₆ was only evidenced in a fetal liver cDNA, while transcripts of VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ and VEGF₁₈₉ were evidenced in a number of tumor cells and tumor tissues. All VEGF isoforms have leader sequences for secretion, but only
30 the two smallest forms are secreted efficiently (see, for example, G. Martiny-Baron and D. Marmé, VEGF-mediated tumor angiogenesis: A new target for cancer therapy, Curr. Opin. Biotechnol., 6, pp. 675-680 (1995)).

Suitable amounts of VEGF were and are still required both
35 for the development and improvement of existing

approaches for tumor therapy and for characterizing VEGF. During the early stages of work carried out in context with the present invention, all that was described was the recombinant production of VEGF in insect cells by means of the baculovirus expression system (for example B.L. Fiebich et al., Synthesis and assembly of functionally active human vascular endothelial growth factor homodimers in insect cells, Eur. J. Biochem., **211**, pp. 19-26 (1993)). *Saccharomyces cerevisiae* (S. Kondo et al., The shortest isoform of human vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF₁₂₁) produced by *Saccharomyces cerevisiae* promotes both angiogenesis and vascular permeability, Biochim. Biophys. Acta, **1243**, pp. 195-202 (1995)), the yeast *Pichia pastoris* (D. Mohanraj et al., Expression of biologically active human vascular endothelial growth factor in Yeast, Growth factors, **12**, pp. 17-27 (1995)) and *Escherichia coli* (G. Siemeister et al., Expression of biologically active isoforms of the tumor angiogenesis factor VEGF in *Escherichia coli*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **222**, pp. 249-255 (1996)) followed as further production organisms. Biologically active VEGF was produced with all these recombinant systems. However, the *E. coli* expression system is complicated with regard to purification and reconstitution of the protein since the latter is packaged into inclusion bodies.

Examples

Summary

The establishment of controllable *Physcomitrella patens* mass cultures (Reutter and Reski, loc. cit.) and methods of transferring DNA into the moss *Physcomitrella patens* (K. Reutter, Expression heterologer Gene in *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. [Expression of

heterologous genes in *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G.], Ph.D. thesis, University of Hamburg (1994)) created the basic prerequisites for the biotechnological exploitation of this plant.

5

Work carried out at the beginning demonstrated the long-term stability of the integration using transgenic *Physcomitrella*-lines originating from Reutter (loc. cit., 1994). Expression of the heterologous *npt II* and *gus* genes, which were employed by way of example for this purpose, was still detectable after four years.

10

The *Physcomitrella* bioreactor culture was optimized. A stirrer was developed which brings about comminution of the protonemata and thus ensures the required homogeneity of the culture at continuous speeds of 300-500 rpm. Standardized sampling was thus made possible. At the same time, the incoming air was distributed more uniformly in the liquid culture. Under these conditions it was demonstrated that biomass and protein development without external pH regulation proceed in the same manner as with pH regulation; surprisingly, the latter is therefore not necessary. A weekly biomass production of 500 mg of dry weight, or 22 mg of total protein, per litre was obtained under semi-batch conditions. This means an increase in biomass production by a factor of five over the conventional 5 l glass flask culture. Reducing the salt concentrations of the Knop medium to one tenth led to similar data and thus to reduced costs.

20

25

30

Addition of 5mM ammonium tartrate accelerated biomass development by reducing the lag phase. Simultaneously, the addition of ammonium tartrate gave cultures which comprised virtually exclusively chloronema cells. It was demonstrated with the aid of flow cytometry that virtually one hundred percent of the cells of these

35

cultures were at the G2/M phase of the cell cycle. This result was confirmed by further physiological studies with auxin and by studies with the differentiation-specific mutants *call12* and *call13*, and it was concluded
5 that caulonema cells are in the G1/G0 phase most of the time, while chloronema cells are predominantly in the G2/M phase.

A promoter was studied for possible inducibility in moss
10 by using the agrobacterial 1'-promoter. The β -glucuronidase (*gus*) gene was used as marker gene. In transiently transformed moss protoplasts (transformation rate = 3×10^{-4}), expression of the *gus* gene was observed following induction with 5 μ M indole-3-acetic acid. No
15 expression was observed in any of the controls.

The gene for the 121 amino acid splice form of the human vascular endothelial growth factor (VEGF₁₂₁) was transferred into *Physcomitrella* at transformation rates
20 of 0.5×10^{-5} and 3.3×10^{-6} . To this end, the gene was cloned behind the constitutive 35S promoter and into the transformation vector pRT99, which is suitable for plants. In a second approach, the sequence encoding the corresponding human ER transit peptide was additionally
25 cloned. Integration of the heterologous DNA was confirmed and the type of integration described by subjecting the stable transformants obtained to Southern analysis. Northern analysis confirmed the existence of the *nptII* and the two VEGF transcripts in these transformants.
30 VEGF₁₂₁ expression in the moss cells was demonstrated by indirect immunofluorescence. The protein was unambiguously localized in the cells with the aid of a confocal laser scanning microscope. These studies revealed for the transformants without transit peptide
35 that the protein is localized in particular in the cytoplasm. In the transformants which additionally

contain the ER transit peptide, the protein can be found in the nuclear regions and in the apical regions of the apical cells, regions with a very high ER content. The biological activity of the heterologous protein produced in accordance with the invention was verified by carrying out ELISA assays and two functionality assays with the VEGF protein obtained from the culture medium.

10 Materials and methods:

Unless otherwise specified in the text, the chemicals used were analytical-grade quality and obtained from Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) and Sigma (Deisenhofen).

15 The solutions were made with purified, pyrogen-free water, hereinbelow termed H₂O, from a Milli-Q water purification system (Millipore, Eschborn).

20 Restriction endonucleases, DNA-modifying enzymes and molecular biology kits were obtained from AGS (Heidelberg), Amersham (Braunschweig), Applied Biosystems (Weiterstadt), Biometra (Göttingen), Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim), Genomed (Bad Oeynhausen), New England Biolabs (Schwalbach/Taunus), Novagen (Madison, Wisconsin, USA), Pharmacia (Freiburg), Qiagen (Hilden) and Stratagene (Heidelberg). Unless otherwise specified, they were used in accordance with the manufacturer's instructions.

30 Vectors and constructs

The plasmid pCYTEXP-VEGF₁₂₁ is a derivative of pCYTEXP1 (T.N. Belev et al., A fully modular vector system for the optimization of gene expression in *Escherichia coli*, Plasmid, **26**, pp. 147-150 (1991)), in which the cDNA of human VEGF₁₂₁ is integrated for expression in *E. coli*. The

VEGF₁₂₁ cDNA is excized from pCYTEXP-VEGF₁₂₁ using the restriction endonucleases *Nde* I and *Sal* I, purified, made blunt-ended and cloned into the *Sma* I cleavage site of pRT101 (R. Töpfer et al., A set of plant expression
5 vectors for transcriptional and translational fusions, Nucleic Acids Res., **15**, p. 5890 (1987)) between the 35S promoter and the polyadenylation sequence of CaMV. Using *Hin* dIII, the cassette thus obtained is again excized and cloned into the *Hin* dIII restriction cleavage site of the
10 transformation vector pRT99. pRT99 contains not only a multiple cloning site, but also the neomycin phosphotransferase gene under the regulation of the 35S promoter and the corresponding polyadenylation sequence of CaMV (R. Töpfer et al., Versatile cloning vectors for
15 transient gene expression and direct gene transfer in plant cells, Nucleic Acids Res., **16**, p. 8725 (1988)). This gene confers resistance to the antibiotic G418 in stably transformed plants. The plasmids were replicated in the *Escherichia coli* strain DH5 α (J. Sambrook et al.,
20 Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989)).

Using the restriction enzymes *Bam* HI and *Bgl* II, the cDNA is excized from the vector pVE-121, which was originally
25 constructed for expressing VEGF₁₂₁ in insect cells and which additionally to the VEGF₁₂₁ sequence comprises the DNA encoding the natural transit peptide which, in animal cell systems, mediates secretion into the medium via the endoplasmic reticulum (Fiebich et al., Synthesis and
30 assembly of functionally active human vascular endothelial growth factor homodimers in insect cells, Eur. J. Biochem., **211**, pp. 19-26 (1993)), and, using pRT101, cloned into pRT99 and verified.

35 Plasmid pNA201 is a derivative of the binary vector pBI101 (A.R. Jefferson et al., Assaying chimeric genes in

plants: The GUS gene fusion system, Plant Mol. Rep., 5, pp. 387-405 (1987)). It contains the *nptII* gene under the nopalin synthase promoter as selection marker for plants. The *gus* gene, which is also present, is regulated by the 1'-promoter from *Agrobacterium tumefaciens*. pNA201 is suitable for the direct transformation of *Physcomitrella patens*.

Antibodies

Two different antibodies against the VEGF protein are used. The first antibody is a rabbit-anti-VEGF antibody and directed against a synthetic peptide which corresponds to amino acids 1-20 of the native human VEGF (Fiebich et al., loc. cit. (1993)). The second antibody is a monoclonal mouse antibody directed against the human VEGF₁₂₁ protein (R&D Systems, Wiesbaden).

Plant material

The wild-type strain of the moss *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G., which originates from the collection of the Genetics Group at the Department of General Botany, University of Hamburg, is employed. Its origin is the strain 16/14, which had been collected by H.L.K. Whitehouse in Gransden Wood, Huntingdonshire (England) and had been subcultured from a spore.

The wild-type strain is grown either in liquid culture with Knop medium (R. Reski and W.O. Abel, Induction of budding on chloronemata and caulonemata of the moss, *Physcomitrella patens*, using isopentenyladenine, Planta, 165, pp. 354-358 (1985)) or on solid Knop medium with 1% oxoid agar (Unipath, Basingstoke, England). Liquid cultures were performed as described by Reski (loc. cit., 1990).

Bioreactor culture

For mass cultivation, plant material is introduced into a 7 l round-bottom glass flask bioreactor equipped with a double jacket (Applikon Biotek, Knüllwald). In this bioreactor system, waste air condenser, aeration tube, pH electrode (Conducta, Gerlingen), temperature sensor, stirring device, sampling tube and the inlets for acid, base and medium are introduced into the culture volume from above through bores in the lid. Cultures are performed at 25°C and are controlled by means of a suitably adjusted water bath which is connected to the double jacket. In experiments which are carried out with pH regulation, the pH is kept constant at 5.8 by means of the titration unit. Temperature measurements and pH regulation are carried out with the Biocontroller ADI 1030 (Applikon Biotek, Knüllwald). The stirrer speed can be varied by means of the motor controller ADI 1012 (Applikon Biotek, Knüllwald). The culture medium is aerated constantly with 1 bar of air via a porous injection element. To ensure sterility in the culture vessel, all of the inlet and exhaust lines are provided with filter sterilization units (Midisart, 0.2 µm; Sartorius, Göttingen). The bioreactor culture is performed in a controlled-environment cabinet with lateral illumination (white light; Osram L 40 W/20; max. 100 µmol s⁻¹ m⁻²). The cultures are inoculated with 0.5 - 1g wet weight plant material per litre of bioreactor culture under sterile conditions. The sampling tube is located at the same level as the stirrer, thus ensuring uniform sampling while stirring. Small sample quantities (< 100 ml) are taken using a sterile syringe via a Luer lock connection, while large sample volumes are removed using, for example, a peristaltic pump type 302/3A equipped with head 501 RI (Sartorius, Göttingen).

Chloronema cultures of the wild type are generated by supplementing the Knop medium with 5 mM ammonium tartrate.

- 5 The yield of biologically active heterologous protein which is secreted can be increased markedly when the stabilizer polyvinylpyrrolidone (PVP) is present in the culture medium.
- 10 Differentiation of the caulonema, which takes place during protonema development, can be induced and increased by exogenous addition of physiological amounts of auxin, suitable concentrations being, for example, 5 $\mu\text{mol/l}$ of indole-3-acetic acid (IAA).
- 15 For performing the liquid culture of transformants under selection pressure, 50 mg/l of the antibiotic G418 (Calbiochem, Bad Soden) are added to the Knop medium. To this end, the cultures are removed by filtration over
- 20 sterile 100 μm sieves (Wilson Sieves, Nottingham, England) every ten days immediately prior to comminution and transferred into Erlenmeyer flasks filled with selection medium.
- 25 For the nutrient element experiments, the Knop medium is diluted 1:10 with H_2O .

Transformation

- The chosen transformation method is the PEG-mediated
- 30 direct DNA transfer into protoplasts as described by Reutter and Reski (loc. cit., 1996). 50 μg of plasmid DNA is employed for 3×10^5 protoplasts in each transformation. Protoplast regeneration and selection for stable
- transformants is carried out as described by Reutter and
- 35 Reski (loc. cit., 1996), unless otherwise specified.

Indirect immunofluorescence

Buffer: MSB: 100 mM PIPES; 5-10 mM EGTA, 5 mM MgSO₄, pH 6.8

F-MSB: MSB + 5% DMSO

5 E-MSB: MSB + 5% DMSO + 5% Nonidet

W-MSB: MSB diluted 1:2 with H₂O (wash buffer)

Enzyme solution: 1% cellulase, 1% pectinase, 2%
10 Driselase in MSB, pH 5.6 (all from Sigma, Deisenhofen)

The moss protonemata are fixed in 1.25% glutaraldehyde in F-MSB (v/v) by incubation for no longer than 10 minutes and briefly washed in W-MSB. Then, the protonemata are
15 incubated with 2% paraformaldehyde in MSB (v/v) for 40 minutes and washed 3x with W-MSB (rinse 1x; wash 2x for 5 min).

Free aldehydes which cannot be eliminated by washing are
20 reduced by adding MSB and a spatula-tipful of solid boron hydride, with an incubation time of 10 minutes. The boron hydride is removed by three washes with W-MSB.

In the next step, the cell walls are made permeable by
25 adding the enzyme solution for 10 minutes. The enzymatic reaction is quenched by changing the pH (MSB, pH 6.8). Again, the mixture is washed 3x with W-MSB.

Chlorophylls are extracted by incubation with a detergent
30 solution over a period of 120 minutes. The solution is then removed by three washes with W-MSB.

After this preparation, the moss protonemata can be incubated with the primary antibody (anti-VEGF; dilution
35 1/50). This is done at 37°C for 45 minutes. After three washes with W-MSB, the labeled secondary antibody (anti-

rabbit or anti-mouse; dilution 1/30; labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC) (Molecular Probes, Leiden, Netherlands)) is added for 45 minutes at 37°C. In addition to the 3 wash steps as above, the mixture is
5 washed once with W-MSB + 0.1% Triton. The protonemata are subsequently taken up in W-MSB and stored at 4°C at least overnight.

The material is evaluated with the aid of a confocal
10 laser scanning microscope (CLSM) type TCS 4D (Leica Lasertechnik, Heidelberg) and the software Scanware 5.0 (Leica Lasertechnik, Heidelberg).

To analyze the samples under the CLSM, they are placed on
15 a slide into the mounting solution (Dabco, Sigma, Deisenhofen). Excitation of the fluorescent dye FITC coupled to the secondary antibody is carried out with the aid of an argon-krypton laser at a wavelength of 488 nm. FITC emits the light at a wavelength of 528 nm.

20

ELISA assay

The VEGF protein in the culture medium, which is formed in suitably transformed moss plants, is determined qualitatively and quantitatively by conventional methods
25 using ELISA assays and the above-described antibodies. An amount of 200 µl of culture medium is used directly in the ELISA assay.

Functionality assays

The biological activity of the recombinantly formed VEGF obtained from the culture medium is checked in a
5 mitogenic assay (Miyazono et al., Purification and properties of an endothelial cell growth factor from human platelets, J. Biol. Chem., **262**, pp. 4098-4103 (1987)) and in a 'Day-13 chorioallantoic-membrane
10 angiogenesis assay' (Wilting et al., A morphological study of the rabbit corneal assay, Anat. Embryol., **183**, pp. 1167-1174 (1991)). The culture medium is subjected beforehand to ultrafiltration, then lyophilized and subsequently resuspended in buffer. If desired, a further purification step using a cation column may be carried
15 out.

Induction of the 1'-promoter

The inducibility of the 1'-promoter by auxin is assayed with 5 $\mu\text{mol/l}$ of indole-3-acetic acid (IAA). Five days
20 after transformation, 100 μl protoplast aliquots of a transformation reaction with pNA201 are transferred into the wells of a 96-well microtiter plate (Nunc, Wiesbaden). The protoplast suspensions are incubated for five hours with IAA (end concentration = 5 μM). The
25 induction experiments are evaluated directly after the incubation period with the aid of the qualitative β -glucuronidase assay.

Qualitative β -glucuronidase assay

30 The β -glucuronidase activity is determined in a qualitative assay (A.R. Jefferson, Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system, Plant Mol. Rep., **5**, pp. 387-405 (1987)).

Substrate buffer: 50 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 50 mM Na_2HPO_4
35 50 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1% (v/v) Triton X-

50 mM NaH_2PO_4 10 mM EDTA, pH 7.0
4 mg/ml PVP (MW 10 000)

5 Staining solution: 12.5 mg of 5-bromo-4-chloro-3-indolylglucuronic acid (Biomol, Hamburg) dissolved in 250 μl of N,N-dimethylformamide/50 ml of substrate buffer

10 Moss protonemata and moss protoplasts in Knop or regeneration medium are incubated for up to 72 hours at 37°C in an equal volume of staining solution and evaluated immediately thereafter using a microscope.

15

Results

Homogeneity of the bioreactor culture; sampling

Only homogeneous cultures ensure that sampling from cell cultures is standardized. After prolonged culture, protonema growth into long cell filaments frequently leads to cell aggregates and thus to inhomogeneous distribution of the plant material in the liquid cultures. To avoid such aggregation, the protonemata are comminuted at specific intervals - in the bioreactor every other day from day 10 and in shake culture every 12 days - by using high-speed stirrers/homogenizers. To make possible continuous conditions in the bioreactor while simultaneously standardizing sampling even over a prolonged culture period, it is recommended to modify a turbine stirrer with three stirrer blades by grinding the edges of the stirrer blades, thus transforming them into shear blades. Constant "stirring" at 300-500 rpm thus makes it possible to operate homogeneous bioreactor cultures.

35

Biomass development (in DW [mg/l]) over a period of 35 days (840 h) at 500 rpm in the control cultures with the turbine stirrer is the same as in bioreactor cultures stirred with the shear-blade stirrer.

5

Culture homogeneity is assessed by comparing in each case six parallel samples. The dry weight of plant material from a sample volume of 100 ml is determined as the comparison parameter. When using an unmodified turbine stirrer, the standard deviation increases with increasing biomass concentration. As a consequence of stirring with the shear-blade stirrer, the standard deviations of the samples taken remain low. This allows the conclusion that a uniformly homogeneous culture can be obtained with the modified stirrer over a period of 35 days.

Studies into the inducibility of the 1'-promoter
In the plasmid pNA201, the 1'-promoter is positioned upstream of the *gus* gene and acts as control element. The known β -glucuronidase assay is suitable as detection assay for induction experiments with the moss. Experiments with transgenic tobacco show that the 1'-promoter leads to expression of β -glucuronidase in tissue with a high auxin content, and it is therefore assumed that this promoter is auxin-dependent. The inducibility of the 1'-promoter by auxin in *Physcomitrella patens* is studied in transiently transformed protoplasts.

The transformation reactions are subjected to the β -glucuronidase assay with (5 h) and without incubation with 5 μ M indole-3-acetic acid (IAA). In the controls without addition of IAA, evaluation under the microscope reveals no blue protoplasts in any of the reactions. In contrast, the evaluation of the protoplasts incubated with auxin confirms the expression of the *gus* gene. Based on the blue protoplasts, a transformation rate of 3×10^{-4}

is achieved. This is a clear suggestion that the 1'-promoter is inducible by the plant hormone auxin in transiently transformed moss protoplasts.

5 Generation of the vectors for the VEGF transformations

To transform the cDNA of VEGF₁₂₁ without leader sequence, termed VEGFC hereinbelow, and the cDNA of VEGF₁₂₁ with leader sequence, termed VEGFP hereinbelow, into *Physcomitrella*, it is necessary to clone the sequences
10 between a promoter/terminator unit which is suitable for plants. The 35S CaMV promoter and the corresponding polyadenylation signal are chosen for this purpose. The suitably prepared VEGF cDNA sequences are cloned into the *Sma* I restriction cleavage site of the multiple cloning
15 site of vector pRT101.

The resulting vectors (pRT101VEGFC 3 and VEGFP 21) are sequenced with a primer derived from the terminal region of the 35S promoter, and the correct integration between
20 promoter and polyadenylation site is verified.

The resulting cassettes are excized with the restriction enzyme *Hin* dIII and cloned into the actual transformation vector pRT99 into the *Hin* dIII cleavage site (pRT99VEGFC
25 3 and VEGFP 21). The orientation of the cassettes relative to the NPTII cassette can be determined by restriction with *Sma* I and *Hinc* II. In the case of promoter-to-polyadenylation signal orientation, a 5250 (VEGFC) and a 5380 bp (VEGFP) fragment are obtained,
30 while the reverse orientation gives a 1100 (VEGFC)/1230 (VEGFP) and a 4150 bp (VEGFC and P) fragment. The restriction analyses reveal only a 5250/5380 bp fragment, and the VEGFC/P cassettes have thus been incorporated in promoter-to-polyadenylation signal orientation relative
35 to the *nptII* gene of pRT99.

VEGFC transformations into *Physcomitrella*

The absolute transformation rate for the transformation of the VEGFC construct in wild-type protoplasts after repeatedly changing from Knop medium to selection medium is 0.5×10^{-5} , with constant stability of the transformants.

Demonstration of the integration of the transformed plasmid

Successful integration into the plant genome is demonstrated by Southern hybridization.

Probes used are firstly an *Nco* I fragment of the *npt* II gene from pRT99 and secondly an *Nde* I/*Sal* I VEGFC fragment from pCYTEXP-VEGF₁₂₁.

The signals detected in the uncleaved total DNA of the transformants confirm successful integration of the plasmid DNA into the plant genome. Whether all of the 35S VEGFC PolyA cassette is obtained even after integration is tested by restriction with *Hin* dIII. If the cassette has remained intact upon integration, this restriction enzyme excizes a 1100 bp fragment from the total DNA.

The hybridization pattern with the VEGFC probe reveals a 1100 bp fragment for all transformants. The integration of the complete VEGFC expression unit, which is a prerequisite for the correct transcription and expression of VEGF₁₂₁ in the moss, has thus been demonstrated.

Demonstration of the transcription of the heterologous genes

The transcripts of the heterologous genes VEGFC and NPTII of the transformants are detected with the nonradioactive DIG detection system using the VEGF and the NPT II probes. With 760 nucleotides for the VEGFC transcript and 1100 nucleotides for the NPT II transcript, the sizes of the transcripts detected in the fluorogram are within the

order of magnitude expected for each case. As expected, none of the two heterologous transcripts are detected in the WT control.

- 5 Analysis of the transformants with human transit peptide
The PEG-mediated DNA transfer of 50 µg of pRT99P 21 plasmid DNA per transformation reaction generates transformants which are permanently stable on selection medium. A stable transformation rate of 3.3×10^{-6} results.

10

Demonstration of the integration of the transformed plasmid

- Integration of the above-described transformants with transit peptide is demonstrated as described above by
15 Southern hybridization using the described probes, and hybridization of *Hin* dIII-cleaved total DNA with the VEGF probe reveals a 1230 bp fragment: demonstration of the completeness of the integrated 35S VEGFP PolyA cassette.

- 20 Demonstration of the transcription of the heterologous genes

Both NPTII and VEGFP transcripts can be detected by the method outlined above.

- 25 Detection of human VEGF₁₂₁ in transgenic moss cells using the confocal laser scanning microscope

- In this method, the test protein is labeled directly in mounted cells. The evaluation is done under the confocal laser scanning microscope, which has an improved
30 resolution power compared with a normal light microscope.

- The recombinant VEGF₁₂₁ protein - if detectable in the moss cells - should accumulate in the cytoplasm in VEGFC transformants. In the VEGFP transformants, it should be
35 detectable in the ER system if the transit peptide is functional as signal in the moss.

The expression of human VEGF₁₂₁ in transgenic moss cells has been demonstrated successfully with the indirect immunofluorescence method and a computer-aided evaluation with the confocal laser scanning microscope. In addition, it is demonstrated that, in transgenic moss, VEGF₁₂₁ is successfully transported into the endoplasmic reticulum in the presence of the corresponding human transit peptide.

10

Assay for the presence of VEGF in the culture medium

A 200 µl aliquot of the culture medium in the presence of PVP is assayed by ELISA and shows that the moss plants transformed with the expression cassette including transit peptide encoding sequence are capable of releasing VEGF into the medium. The positive results allow the conclusion to be drawn that a functional VEGF protein is present.

15

Assay of the biological activity

Both assays employed for verifying the biological activity of the VEGF protein released into the culture medium give positive results and confirm that VEGF produced in accordance with the invention can be obtained from the culture medium with the desired biological activity.

20

25

Patent Claims

- 5 1. A method for the production of heterologous
proteinaceous substances in plant material,
characterized in that moss tissue is used as plant
material and that the proteinaceous substances
produced are obtained from the culture medium
10 essentially without disrupting the producing tissues
or cells.
2. The method according to claim 1, characterized in
that the proteinaceous substance released into the
15 culture medium is biologically active.
3. The method according to claim 1 or 2, characterized
in that a culture medium is used which is essentially
free from sugars, vitamins and phytohormones or
20 functional fragments thereof.
4. The method according to any of claims 1 to 3,
characterized in that the moss tissue is selected
from the group of the mosses including liverworts.
25
5. The method according to claim 4, characterized in
that the moss tissue is selected from mosses of the
group consisting of *Physcomitrella*, *Funaria*, *Sphagnum*
and *Ceratodon*.
30
6. The method according to claim 4, characterized in
that the moss tissue is selected from liverworts of
the group consisting of *Marchantia* and *Sphaerocarpos*.

Patent Claims

- 5 1. A method for the production of heterologous
proteinaceous substances in plant material,
characterized in that moss tissue is used as plant
material and that the proteinaceous substances
produced are obtained from the culture medium
10 essentially without disrupting the producing tissues
or cells.
2. The method according to claim 1, characterized in
that the proteinaceous substance released into the
15 culture medium is biologically active.
3. The method according to claim 1 or 2, characterized
in that a culture medium is used which is essentially
free from sugars, vitamins and phytohormones or
20 functional fragments thereof.
4. The method according to any of claims 1 to 3,
characterized in that the moss tissue is selected
from the group of the mosses including liverworts.
25
5. The method according to claim 4, characterized in
that the moss tissue is selected from mosses of the
group consisting of *Physcomitrella*, *Funaria*, *Sphagnum*
and *Ceratodon*.
30
6. The method according to claim 4, characterized in
that the moss tissue is selected from liverworts of
the group consisting of *Marchantia* and *Sphaerocarpos*.

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
12. April 2001 (12.04.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/25456 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/82.
C12P 21/02, A01H 5/00 // C07K 14/52

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/03374

(22) Internationales Anmeldedatum:
27. September 2000 (27.09.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 47 290.4 1. Oktober 1999 (01.10.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): GREENOVATION PFLANZENBIOTECH-
NOLOGIE GMBH [DE/DE]; Sonnenstrasse 5, 79104
Freiburg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): RESKI, Ralf [DE/DE];
Am Osterbach 26, 79254 Oberried (DE). GORR, Gilbert
[DE/DE]; Wietzegraben 64, 30179 Hannover (DE).

(74) Anwalt: STÜRKEN, Joachim; Engesserstrasse 4b,
79108 Freiburg (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DK,
DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT,
RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 27. Dezember 2001

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR PRODUCTION OF PROTEINACEOUS SUBSTANCES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG PROTEINÖSER SUBSTANZEN

(57) Abstract: The invention relates to a new method for production of heterologous proteinaceous substances in plant material. In the preferred method selected complete moss plants are cultivated and the desired target substances obtained from the culture medium essentially without disturbing the produced tissues and cells. The method allows a cost effective production of all manner of heterologous proteins in their respective active form under standardisable conditions.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung beschreibt ein neues Verfahren zur Herstellung heterologer proteinöser Substanzen in pflanzlichen Materialien. Nach einer bevorzugten Ausführungsform werden ausdifferenzierte vollständige Moospflanzen kultiviert und die Gewinnung der gewünschten Zielsubstanz aus dem Kulturmedium erfolgt im wesentlichen ohne Aufbrechen der produzierenden Gewebe oder Zellen. Unter Anwendung des beschriebenen Verfahrens können jedwede heterologe Proteine in ihrer jeweiligen biologisch aktiven Form kostengünstig und unter standardisierbaren Bedingungen hergestellt werden.

WO 01/25456 A3

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

7

Applicant's or agent's file reference 00081.7	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/DE00/03374	International filing date (day/month/year) 27 September 2000 (27.09.00)	Priority date (day/month/year) 01 October 1999 (01.10.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/82		
Applicant GREENOVATION BIOTECH GMBH		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>1</u> sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

RECEIVED
NOV 05 2002
TECH CENTER 1600/2900

Date of submission of the demand 09 April 2001 (09.04.01)	Date of completion of this report 31 January 2002 (31.01.2002)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE00/03374

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
 pages 1-26, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages 1-6 with fax of, filed with the letter of 18 January 2002 (18.01.2002)
- ☐ the drawings:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1 - 6	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1 - 6	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1 - 6	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

This report makes reference to the following documents:

- D1: REUTTER, K., ET AL: PLANT TISSUE CULTURE AND BIOTECHNOLOGY, volume 2, number 3, 1996, pages 142-147, XP001002564
- D2: WO-A-99/38990
- D3: DE-A-196 29 402
- D4: BORISJUK, N.V., ET AL: NATURE BIOTECHNOLOGY, volume 17, May 1999, pages 466-469, XP002169838
- D5: RESKI, R.: BOTANICA ACTA, STUTTGART, DE, volume 111, February 1998, pages 1-15, XP000985073
- D6: FIREK, S., ET AL: PLANT MOLECULAR BIOLOGY, NL, NIJHOFF PUBLISHERS, DORDRECHT, volume 23, 1993, pages 861-870, XP002033959
- D7: WO-A-97/04122
- D8: WO-A-98/36085
- D9: WO-A-91/02066
- D10: WEI, W.S., ET AL: JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, volume 50, number 2, 1 October 1996, pages 225-233, XP004037059.

1. Amended set of claims

The amendments in the resubmitted set of claims meet the requirements of PCT Article 34(2)(b). The use of

protonema moss tissue as plant material is supported by the description, for example on page 11, lines 27-29; page 18; page 21, lines 5-8 and 13-21. The deletion of "essentially" is supported by the examples, particularly on page 26, lines 10-15, which give evidence of secreted VEGF in the culture medium.

2. Inventive step in Claims 1-6

The relevant prior art in D1 describes the production of a heterologous protein in bioreactor cultures of completely different moss plants (*Physcomitrella patens*). The recombinant protein is released by cell disintegration in this method. The method as per Claim 1 differs from D1 in that the heterologous protein is not localised in the plant host cell/tissue. The technical effect of the subject matter of Claim 1 is therefore the production of a heterologous protein which is produced in a moss plant without destroying the host plant. Claim 1 therefore addresses the technical problem of providing an economical method for producing a heterologous protein in cultivated moss plants, in which the host plant/cell/tissue is capable of functioning as a continuous producer of the required protein. The solution to said technical problem consists in transforming the moss plant with an expression vector, which allows the heterologous protein to be processed on the secretory pathway by means of a signal peptide, with the result that the recombinant protein can be secreted into the culture medium and purified there without difficulty.

The prior art extensively describes the secretory expression of heterologous proteins in higher plants

and therefore the extraction of such proteins without destroying the host plants (D2 in photoautotrophic plants, D3, D4, D6-D10). D2, D3, D4 and D7 for example disclose the use of secretory signal peptides to control the proteins in the culture medium. D2 also mentions the reduction in costs achieved by avoiding cell disintegration, the simpler purification (page 18, lines 1-3), and the possibility of applying this method to a large number of plants (page 5, lines 26-31). However, the prior art relates exclusively to higher plants. With said higher plants, secretion takes place by means of the phenomenon of rhizosecretion (guttation, exudation of the protein from specific organs such as leaves by means of root hydrostatic pressure) as shown in D2 and D4, or from cell suspension cultures, i.e. individual cells and not whole intact plants (e.g. D6).

Moss plants do not have roots similar to higher plants so the principle of rhizosecretion cannot be applied to mosses, just as secretion from cell suspension cultures is not relevant to the present invention, i.e. the use of whole moss plants.

Claims 1-6 therefore involve an inventive step and meet the requirements of PCT Article 33(3).

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

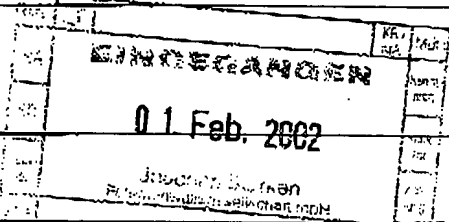
Fr. Rappold

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 00081.7	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/03374	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 27/09/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 01/10/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/82		
Anmelder GREENOVATION PFLANZENBIOTECHNOLOGIE GMBH et al.		



- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).
Diese Anlagen umfassen insgesamt 1 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 09/04/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 31.01.2002
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Strobel, A Tel. Nr. +49 89 2399 7362 

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-26 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-6 mit Telefax vom 18/01/2002

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von inigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 1-6 Nein: Ansprüche
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche 1-6 Nein: Ansprüche
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche 1-6 Nein: Ansprüche

**2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt**

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

Es wird auf folgende Dokumente verwiesen:

- D1: REUTTER, K., ET AL.: PLANT TISSUE CULTURE AND BIOTECHNOLOGY, Bd. 2, Nr. 3, 1996, Seiten 142-147, XP001002564
- D2: WO 99 38990 A
- D3: DE 196 29 402 A
- D4: BORISJUK, N.V., ET AL.: NATURE BIOTECHNOLOGY, Bd. 17, Mai 1999, Seiten 466-469, XP002169838
- D5: RESKI R: BOTANICA ACTA, STUTTGART, DE, Bd. 111, Februar 1998, Seiten 1-15, XP000985073
- D6: FIREK S ET AL: PLANT MOLECULAR BIOLOGY, NL, NIJHOFF PUBLISHERS, DORDRECHT, Bd. 23, 1993, Seiten 861-870, XP002033959
- D7: WO 97 04122 A
- D8: WO 98 36085 A
- D9: WO 91 02066 A
- D10: WEI W S ET AL: JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, Bd. 50, Nr. 2, 1. Oktober 1996, Seiten 225-233, XP004037059

1. Geänderter Anspruchssatz

Die Änderungen im neu eingereichten Anspruchssatz genügen den Erfordernissen von Artikel 34(2)(b) PCT. Die Verwendung von Protonema-Moosgewebe als pflanzliches Material ist gestützt durch die Beschreibung, etwa S. 11, Zeilen 27-29, S. 18, S. 21, Zeilen 5-8 und 13-21. Die Streichung von "im wesentlichen" ist durch die Beispiele gestützt, v.a. S. 26, Zeilen 10-15, wo der Nachweis von sekretiertem VEGF im Kulturmedium erfolgt.

2. Erfinderische Tätigkeit der Ansprüche 1-6

D1 als relevanter Stand der Technik beschreibt die Produktion eines heterologen Proteins in Bioreaktorkulturen vollständig differenzierter Laubmoospflanzen (*Physcomitrella patens*). Das rekombinante Protein wird hierbei durch

Zellaufschluß freigesetzt. Im Unterschied zu D1 ist im Verfahren von Anspruch 1 das heterologe Protein nicht in der pflanzlichen Wirtszelle/dem pflanzlichen Wirtsgewebe lokalisiert. Der technische Effekt des Gegenstands von Anspruch 1 ist also die Herstellung eines heterolog in einer Moospflanze hergestellten Proteins ohne die Zerstörung der Wirtspflanze. Die Anspruch 1 zugrunde liegende technische Aufgabe ist somit die Bereitstellung eines kostengünstigen Verfahrens zur Herstellung eines heterologen Proteins in kultivierten Moospflanzen, bei dem die Wirtspflanze/Zelle/Gewebe kontinuierlich als Produzent/in des erwünschten Proteins dienen kann. Die Lösung dieser technischen Aufgabe besteht in der Transformation der Moospflanze mit einem Expressionsvektor, der durch ein Signalpeptid die Prozessierung des heterologen Proteins auf dem sekretorischen Weg ermöglicht, wodurch das rekombinante Protein in das Kulturmedium sekretiert und dort ohne großen Aufwand gereinigt werden kann.

Der Stand der Technik beschreibt ausführlich die sekretorische Expression heterologer Proteine in höheren Pflanzen und somit die Gewinnung solcher Proteine ohne Zerstörung der Wirtspflanzen (D2 in photoautotrophen Pflanzen, D3, D4, D6-D10). D2, D3, D4 und D7 z.B. offenbaren die Verwendung sekretorischer Signalpeptide, um die Proteine in das Kulturmedium zu dirigieren. D2 erwähnt dabei die Senkung der Kosten durch Vermeidung eines Zellaufschlusses, die vereinfachte Reinigung (Seite 18, Zeilen 1-3) sowie die Möglichkeit, dieses Verfahren auf eine große Zahl von Pflanzen anzuwenden (Seite 5, Zeile 26-Zeile 31). Der Stand der Technik bezieht sich aber ausschließlich auf höhere Pflanzen. Hierbei erfolgt wie in D2 und D4 die Sekretion entweder durch das Phänomen der Rhizosekretion (Guttation, Auspressen des Proteins durch den Wurzelflüssigkeitsdruck aus bestimmten Organen wie z.B. Blättern) oder aus Zellsuspensionkulturen, d.h. einzelnen Zellen und nicht ganzen intakten Pflanzen (z.B. D6).

Moospflanzen besitzen keine höheren Pflanzen vergleichbare Wurzeln, das Prinzip der Rhizosekretion ist also nicht auf Moose anwendbar, ebenso wenig wie die Sekretion aus Zellsuspensionkulturen für die vorliegende Erfindung, nämlich ganze Moospflanzen zu verwenden, relevant ist.

Ansprüche 1-6 sind somit erfinderisch (Erfüllung von Artikel 33(3) PCT).

Patentanspruch

5

1. Verfahren zur Herstellung heterologer proteinöser Substanzen in pflanzlichen Materialien, dadurch gekennzeichnet, daß als pflanzliches Material Protonema-Moosgewebe verwendet wird und die Gewinnung der hergestellten proteinösen Substanzen aus dem Kulturmedium ohne Aufbrechen der produzierenden Gewebe oder Zellen erfolgt.

10

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die in das Kulturmedium freigesetzte proteinöse Substanz biologisch aktiv ist.

15

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß ein Kulturmedium verwendet wird, welches frei von Zuckern, Vitaminen und Phytohormonen bzw. funktionellen Fragmenten derselben ist.

20

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Moosgewebe ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus Laubmoosen und Lebermoosen.

25

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Moosgewebe aus Laubmoosen aus der Gruppe bestehend aus *Physcomitrella*, *Funaria*, *Sphagnum* und *Ceratodon* ausgewählt wird.

30

6. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Moosgewebe aus Lebermoosen aus der Gruppe bestehend aus *Marchantia* und *Sphaerocarpos* ausgewählt wird.

GEÄNDERTES BLATT